Fernanda Peixoto Barbosa Nunes

Caracterização do efeito anti-inflamatório da crotoxina sobre a migração celular induzida pela carragenina.

São Paulo
2012

Fernanda Peixoto Barbosa Nunes

Caracterização do efeito anti-inflamatório da crotoxina sobre a migração celular induzida pela carragenina.

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para obtenção de título de Doutor em Ciências, na área de Fisiologia Geral.

Orientadora: Maria Cristina Cirillo

São Paulo
2012

Ficha Catalográfica

Nunes, Fernanda Peixoto Barbosa
Caracterização do efeito anti-inflamatório da crotoxina sobre a migração celular induzida pela carragenina.
95p.

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia

1. *Crotalus durissus terrificus* 2. crotoxina 3.inflamação 4. carragenina . Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr.(a).
Orientador(a)

Dedico este trabalho:

A Deus e à espiritualidade,

Pela proteção, saúde e por todos os ensinamentos...
Pela sabedoria em momentos cruciais...
Por mais essa conquista.

Aos animais utilizados,

Simplesmente essenciais para a realização deste trabalho...
Dedico todo o meu respeito e agradecimento.

Aos meus amados pais Carlos e Sandra,

Os maiores exemplos da minha vida.
Sem palavras para agradecer por todo amor e dedicação.
Graças a esse amor incondicional, me tornei uma pessoa de bem, de valores e uma grande "guerreira". Amo vocês.

Ao meu irmão Gustavo,

Nós dois sabemos o verdadeiro significado das palavras "irmão" e "irmã".
Obrigada por estar sempre torcendo pelas minhas vitórias.
Obrigada por me defender incondicionalmente.

Ao meu anjo Fabio,

Agradeço imensamente a Deus, todos os dias, por ter me levado até você.
Obrigada por dividir comigo cada etapa cumprida deste trabalho.
Obrigada por estar ao meu lado em cada dificuldade e em cada vitória.
Obrigada por ser o meu grande companheiro, o meu amor.

À Cristina

Muito obrigada pela orientação durante esses 9 anos de Instituto Butantan.
Muito obrigada pela oportunidade de desenvolver um trabalho pelo qual eu tanto me dediquei e me orgulho.

Às meninas,

Karine, Karla, Lorraine e Sabrina,

Como foi e como é bom ter vocês ao meu lado...
Obrigada pela amizade tão verdadeira e tão especial...
Obrigada pelo dia-dia mais alegre...
Obrigada pelo apoio incondicional....
Obrigada por dividirem comigo tantas conquistas "profissionais" e "pessoais".

"Tenha um propósito na vida e busque realizá-lo não importando o quanto seja difícil para você e estranho para os outros"

Agradeço...

À Dra. Diva Denelle Spadacci-Morena pela colaboração na parte histológica deste trabalho. Pela sua amizade e carinho, comigo e com a minha família.

Ao Dr. Marcelo L. Santoro por toda ajuda nos ensaios de W. blotting, por todo conhecimento transmitido durante esses anos e por toda a sua amizade.

À Dr. Rita S. Coimbra pela atenção e por toda a ajuda com os protocolos de Imunohistoquímica.

À Dra. Sandra Sampaio, pela colaboração durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Sabrina Ferreira, sem palavras para te agradecer pela nossa "luta" com a Imunohistoquímica. Obrigada pelas fotos, pranchas e pela "paciência".
O resultado final valeu muito a pena.

À Tatiane Lima pela colaboração, dedicação e paciência com os ensaios de Citometria de fluxo.

À Karine, e Karla Vanessa, pela ajuda em inúmeras coletas, experimentos e análises de dados histológicos desde o início deste trabalho.

À Lorraine, pela ajuda em inúmeros experimentos e por toda a colaboração na fase final desta tese.

Ao Márcio e ao Thiago, queridos companheiros de Laboratório. Obrigada por toda ajuda e amizade.

À Fernanda Velhote, por gentilmente ceder seu material tão importante na fase de conclusão deste trabalho.

À Neusa, por toda a colaboração na montagem final desta tese. Obrigada por toda a sua paciência, dedicação e amizade.

À Edna, Jane, Juscelino, Meire e Sr.Manoel, funcionários do Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan pela convivência e pelo carinho que sempre tiveram comigo.

Aos demais pesquisadores, pós-graduandos, estagiários e funcionários do Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan que conviveram comigo durante a realização deste trabalho.

À Roseli, secretária do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, por sempre ter sido muito atenciosa, compreensiva e prestativa. Obrigada pela convivência durante esses 6 anos de pós-graduação.

À Érica, da secretaria da Pós-graduação do Instituto de Biociências (USP), por toda ajuda durante esses anos de pós-graduação.

A CAPES e à FAPESP pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 001

1.1. Envenenamentos ofídicos 001

1.1.1. Veneno de serpentes *Crotalus durissus terrificus* (VCdt) 002

1.2. Considerações gerais sobre a Resposta Inflamatória 004

1.2.1. Mediadores químicos da inflamação 005

1.2.2. Considerações gerais sobre moléculas de adesão 009

1.2.3. O fator de transcrição NF-κB 012

1.3. A carragenina como agente inflamatório 012

1.4. Efeitos modulatórios do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (VCdt) e da crotoxina (ctx) sobre a resposta inflamatória 014

2. OBJETIVO 017

3. MATERIAL E MÉTODOS 018

3.1. Animais 018

3.2. Crotoxina 018

3.3. Agente inflamatório 018

3.4. Planejamento geral 018

3.5. Protocolo experimental 019

3.5.1. Tratamento com a Crotoxina 019

3.5.2. Resposta inflamatória induzida pela Cg 019

3.5.2.1.Obtenção do exsudato peritoneal induzido pela Cg 019

3.5.2.2.Obtenção dos cortes de tecido subcutâneo do coxim plantar 019

3.5.3. Análises histológica 020

3.5.4. Determinação da expressão de moléculas de adesão no tecido subcutâneo do coxim plantar de camundongos 020

3.5.4.1. Ensaios de Imunohistoquímica 020

3.5.5. Determinaçao da expressão de Mac-1 em leucócitos presentes no exsudato peritoneal 021

3.5.5.1. Citometria de fluxo 021

3.5.6. Determinação dos mediadores inflamatórios presentes no exsudato peritoneal 022

3.5.6.1. Dosagem de citocinas 022

3.5.6.2. Dosagem de leucotrieno B_4 e prostaglandina E_2 023

3.5.7. Determinação da expressão de iNOS e de p65 no tecido subcutâneo do coxim plantar após a injeção de Cg 023
3.5.8. Avaliação da participação de glicocorticóides endógenos no efeito anti-inflamatório da CTX sobre a migração celular induzida pela Cg. 025
3.5.8.1. Tratamento com Mifepristone (RU-486 ou Metirapona) 025
3.6. Análises estatísticas 025
3.7. Quadro Sinótico 026
4. RESULTADOS 027
4.1. Migração celular induzida por Cg para o tecido subcutâneo do coxim plantar 027
4.2. Efeito da CTX sobre a migração celular, induzida pela Cg, para o tecido subcutâneo do coxim plantar 027
4.3. Avaliação da expressão de P-selectina, ICAM-1 e PECAM-1 induzida pela Cg no endotélio vascular do tecido subcutâneo..... 031
4.3.1. Efeito da CTX sobre a expressão das moléculas de adesão P-selectina, ICAM-1 e PECAM-1, no endotélio vascular do tecido subcutâneo induzida pela Cg 031
4.4. Determinação da expressão de CD11b/CD18 (Mac-1) em leucócitos presentes no exsudato peritoneal ..... .042
4.4.1. Efeito da CTX sobre a expressão de CD11b/CD18 (Mac-1) em leucócitos presentes no exsudato peritoneal 042
4.5. Determinação da secreção de TNF-α, IL-1β e IL-6 induzida pela Cg no exsudato peritoneal 044
4.5.1. Efeito da CTX sobre a secreção de citocinas: TNF-α, IL-1β e IL-6 044
4.6. Dosagem de Prostaglandina E_2 e Leucotrieno B_4..... 053
4.6.1. Efeito da CTX sobre a secreção de Prostaglandina E_2 e Leucotrieno B_4 053
4.7. Expressão de iNOS e p65 em sobrenadante de macerado de patas de camundongos 056
4.7.1. Efeito da CTX sobre a expressão de iNOS e p65 em sobrenadante de macerado de patas de camundongos..... 056
4.8. Avaliação do efeito dos glicocorticóides no efeito anti-inflamatório da CTX sobre a migração celular induzida pela Cg. 059

4.8.1. Avaliação dos tratamento com Mifepristone e Metirapona no efeito anti-inflamatório da CTX sobre a migração celular induzida pela Cg .. 059

5. DISCUSSÃO 062

6. RESUMO DOS RESULTADOS 067

7. CONCLUSÃO..... 069

8. RESUMO..... 070

9. ABSTRACT 071

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 072

LISTA DE ABREVIATURAS

VCdt	**veneno de *Crotalus durissus terrificus***
CTX	**crotoxina**
CA	**crotapotina**
Cg	**carragenina**
COX-1	**ciclooxigenase-1**
COX-2	**ciclooxigenase-2**
LOs	**lipoxigenases**
12-LO	**12-lipoxigenase**
15-LO	**15-lipoxigenase**
Sal	**salina**
via i.p.	**via intraperitoneal**
via s.c.	**via subcutânea**
PGE_2	**prostaglandina E_2**
LTB_4	**leucotrieno B_4**
LTA_4	**leucotrieno A_4**
TNF-α	**TNF- alfa**
IL	**interleucina**
IL-1β	**interleucina 1β**
IL-4	**interleucina 4**
IL-6	**interleucina 6**
IL-10	**interleucina 10**
ASA	**aspirina**
ATLs	**análogos estáveis de lipoxinas**
NOSs	**óxido nítrico sintetase**
eNOS	**óxido nítrico endotelial**
nNOS	**óxido nítrico neuronal**
iNOS	**óxido nítrico sintetase induzível**
NO	**óxido nítrico**
LXA_4	**lipoxina A_4**
LXs	**lipoxinas**
PAF	**fator de ativação plaquetária**
MCP	***macrophage inflammatory protein-1***
MIF	**mifepristone**
MET	**metirapona**
PSGL-1	**P-selectin glycoprotein ligand-1**
ESL-1	**E-selectin glycoprotein ligand-1**
MadCAM-1	***Mucosal addressin cellular adhesion molecule-1***
GlyCAM-1	***Glycosylation dependent cell adhesion molecule-1***
MAPK	***mitogen activated protein kinases***
NF-κB	**fator de transcrição NF-κB**
JAMs	***junction adhesion molecules***
VVO	**organelas vesículo vacuolares**

1. INTRODUÇÃO

1.1. Envenenamentos ofídicos

No Brasil, os envenenamentos ofídicos englobam aproximadamente 30.000 casos por ano, sendo que quatro são os gêneros de serpentes envolvidos nestes acidentes. O gênero *Bothrops* é o principal deles, responsável por aproximadamente 80% do total de acidentes, seguido pelos gêneros *Crotalus* (7,3%), *Lachesis* (3%) e *Micrurus* (0,7%) (SINAN, 2009).

As serpentes do gênero *Crotalus*, conhecidas popularmente como cascavel, maracambóia e boicininga, são serpentes robustas, ágeis de hábitos terrestres. Estas serpentes são facilmente identificadas pela coloração marrom-amarelada e pela presença de um guizo ou chocalho na sua extremidade caudal (Melgarejo, 2003).

O gênero *Crotalus* no Brasil apresenta uma única espécie, a *Crotalus durissus*, de ampla distribuição geográfica. Essas serpentes são encontradas desde os cerrados do Brasil central, até as regiões áridas e semi-áridas do Nordeste, seguindo pelo extremo Sul e Norte do país, exceto na zona litorânea. Dentro dessa espécie, subdividem-se cinco subespécies: *Crotalus durissus terrificus*, predominante das regiões Sudeste e Sul, sendo a principal subespécie responsável pelos acidentes notificados no país (Fig. 1); a *Crotalus durissus collilineatus*, comum na região centro-oeste, estendendo-se até o estado de Rondônia; a *Crotalus durissus cascavella*, predominante na região Nordeste do páis, e as menos conhecidas, como a *Crotalus durissus ruruima* e a *Crotalus durissus marajoensis*, restritas às savanas de Roraima e da Ilha de Marajó, respectivamente (Melgarejo, 2003).

Figura 1. Serpente *Crotalus durissus terrificus*

1.1.1. Veneno de serpentes *Crotalus durissus terrificus* (VCdt)

O veneno de *Crotalus durissus terrificus* (VCdt) é considerado uma mistura complexa de proteínas e polipeptídeos que interferem em vários processos fisiológicos. O veneno induz efeitos neurotóxico, miotóxico e coagulante (Jorge & Ribeiro, 1992). Dentre as toxinas presentes neste veneno, destacam-se a crotoxina (Slotta & Fraenkel-Conrat, 1938), a crotamina (Moura-Gonçalves & Vieira, 1950), a giroxina (Barrio, 1961), a convulxina (Prado-Francesqui & Vital-Brazil, 1981) e a enzima tipo trombina (thrombin-like) (Raw *et al.*, 1986).

A atividade neurotóxica do veneno é a responsável pelo quadro de paralisia muscular esquelética (fácies neurotóxica), ptose palpebral, diminuição da motricidade ocular e da acuidade visual e insuficiência respiratória (Rosenfeld, 1971; Amorim *et al.*, 1951). Essa atividade é atribuída à crotoxina que ao impedir a liberação de acetilcolina, bloqueia a transmissão na junção neuromuscular (Vital-Brazil & Excell, 1971; Hawgood & Santana de Sá, 1979; Bon *et al.*, 1979; Kini *et al.*, 2003).

O efeito miotóxico do veneno é decorrente da ação da crotoxina e da crotamina. A crotamina é considerada uma proteína básica de baixo peso molecular, sem atividade enzimática e que corresponde a cerca de 17% do veneno total (Ownby *et al.*, 1976; Gopalakrishnakone *et al.*, 1984).

Já a ação coagulante do veneno é atribuída a um componente do tipo trombina (thrombin-like), a giroxina, que converte o fibrinogênio em fibrina, sem a necessidade da formação de trombina, aumentando o tempo de coagulação sanguínea (Sano-Martins *et al.*, 2001).

Assim, o quadro de envenenamento humano por *Crotalus durissus terrificus* caracteriza-se por manifestações sistêmicas, tais como: mal estar, prostração, sudorese, vômitos, sonolência, observadas logo nas primeiras horas após o acidente. Devido à atividade miotóxica do veneno os pacientes acidentados apresentam quadro de rabdomiólise generalizada (Azevedo-Marques, 1985; Magalhães *et al.*, 1986; Jorge & Ribeiro, 1992). Outra manifestação sistêmica importante é a incoagulabilidade sanguínea observada em cerca de 50% dos acidentes crotálicos, em humanos (Jorge & Ribeiro, 1992; Sano-Martins *et al.*, 2001), e também verificada experimentalmente em cães, que apresentaram hipofibrinogenemia e ativação secundária do sistema fibrinolítico (Sousa-e-Silva *et al.*, 2003).

Apesar dos efeitos sistêmicos marcantes, não são observados sinais inflamatórios significativos no local da picada nos acidentes causados pelas serpentes *Crotalus durissus terrificus*, diferente do que é observado em acidentes causados por outros gêneros de serpentes, entre eles, o gênero *Bothrops* (Rosenfeld 1971; Gutierrez & Lomonte, 1989).

A crotoxina (CTX) é o principal componente tóxico do VCdt representando cerca de 60% do veneno total, (Slotta & Fraenkel-Conrat, 1938; Breithaupt, 1976). Trata-se de um heterodímero formado a partir da associação de um polipeptídeo ácido, não tóxico e não enzimático denominado crotapotina (CA) e por uma subunidade básica, responsável pela atividade tóxica e com atividade fosfolipásica (CB) (Habermann & Breithaupt, 1978; Bon *et al.*, 1979; Hendon & Bieber, 1982; Hawgood & Bom, 1991; Sampaio *et al.*, 2010; Faure *et al.*, 2011).

A literatura relata que a atividade da CTX é dependente da ação mútua dos componentes CA e CB, onde o componente CA comporta-se como uma chaperona, direcionando o componente CB ao seu sítio de ação (Bon *et al.*, 1979; Faure & Bon, 1988). Rangel-Santos e colaboradores (2004), estudando a atividade tóxica da CTX ou do componente B isolado de venenos das subespécies *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascavella* ou *Crotalus durissus collilineatus*, observaram que os componentes B apresentam menor atividade neurotóxica e miotóxica, quando comparados à toxina íntegra correspondente. Esses dados reforçam o conceito da importância da associação dos componentes (A e B) para que haja a atividade tóxica.

1.2. Considerações gerais sobre a Resposta Inflamatória

A inflamação por definição é uma resposta complexa do tecido conjuntivo vascularizado frente a uma determinada injúria, que ocorre de maneira estereotipada. Essa resposta, independente da natureza do estimulo lesivo é caracterizada por eventos vasculares, celulares e linfáticos que se desenvolvem com a finalidade de eliminar o agente lesivo, restituir o tecido lesado e manter a homeostasia do organismo (Rankin, 2004; Kumar *et al.*, 2010; Kvietys & Granger, 2012).

Os eventos vasculares da resposta inflamatória compreendem alterações hemodinâmicas, que culminam com o extravasamento de proteínas plasmáticas para o tecido adjacente. Inicialmente, imediatamente após o estimulo lesivo, ocorre uma vasoconstricção transitória seguida de uma vasodilatação que favorece o aumento do fluxo sanguíneo, causando calor e vermelhidão no local da injúria, observada, principalmente, nas vênulas pós-capilares (Blake & Ridker, 2001). Essas alterações são seguidas por mudanças estruturais na parede do vaso caracterizadas, principalmente, pela contração da célula endotelial e abertura de junções entre essas células. Essas aberturas levam ao aumento da permeabilidade vascular e conseqüente extravasamento de proteínas plasmáticas para o tecido intersticial (Rankin, 2004) o que caracteriza o edema inflamatório (Janeway & Travers, 1994; Blake & Ridker, 2001; Tedgui & Mallat, 2001). Ainda, em conseqüência ao extravasamento plasmático, ocorre o aumento da viscosidade do sangue e a redução do fluxo sanguíneo. Essas alterações hemodinâmicas levam à estase sanguínea, marginação leucocitária e migração destas células para o tecido extravascular (Rankin 2004; Kumar *et al.*, 2010).

1.2.1. Mediadores químicos da inflamação

Os mediadores químicos da inflamação atuam de maneira inter-relacionada, nos eventos vasculares e celulares da resposta inflamatória (Rocha e Silva & Garcia-Leme, 1972; Ferreira & Vane, 1973; Majno & Joris, 2004; Rankin, 2004; Ley *et al.*, 2007).

As manifestações uniformes que caracterizam a resposta inflamatória são decorrentes da ação de substâncias endógenas liberadas após o estímulo lesivo, denominadas mediadores químicos da inflamação.

Os mediadores são originados do plasma, tais como os componentes do sistema complemento, do sistema da coagulação e as cininas ou ainda originados de células e de tecidos, tais como a histamina, a serotonina, metabólitos do ácido araquidônico, fator de ativação plaquetário (PAF), óxido nítrico (NO) e interleucinas (Contran *et al.*, 1999; Rankin, 2004; Majno & Joris, 2004).

Particularmente, os metabólitos do ácido araquidônico, também conhecidos como ecosanóides são mediadores lipídicos importantes que atuam em diversos processos fisiológicos e patológicos (Harizi *et al.*, 2008). Quando as células são expostas a diversos estímulos mecânicos, químicos, ou físicos, os fosfolipídios presentes nas membranas das células sofrem ação de fosfolipases celulares, como por exemplo, a fosfolipase A_2, liberando o ácido araquidônico (Rankin, 2004; Kumar *et al.*, 2010, Harizi *et al.*, 2008). Este por sua vez, pode ser metabolizado enzimaticamente por três vias distintas: P-450 epoxiogenase, ciclooxigenases (ciclooxigenase-1 e ciclooxigenase-2) e lipoxigenases. Pela via da P-450 epooxigenase são produzidos os ácidos hidroxieicosatetraenoico (HETEs) e os epóxidos. Pela via das ciclooxigenases (COXs) são geradas as prostaglandinas, prostaciclinas e tromboxanas, enquanto pela via das lipoxigenases (LOs) são gerados os leucotrienos e as lipoxinas (Harris *et al*., 2002; Harizi *et al*., 2008; Serhan *et al.*, 2008). Existem duas isoformas da enzima ciclooxigenase, a COX-1 e a COX- 2. A COX-1 é uma proteína constitutiva encontrada no retículo endoplasmático de vários tipos celulares, enquanto a expressão da COX-2 é induzível por estímulos extras e intracelulares. Já as LOs são mais numerosas e entre estas estão as 5-lipoxigenase (5-LO), 12-lipoxigenase (12-LO), e a 15-lipoxigenase (15-LO) (Kam & See, 2000; Harizi *et al*., 2008). Esses ecosanóides gerados pelas diferentes vias ligam-se aos receptores ligados a proteina-G presentes nas membranas celulares e ativam uma cascata de sinalização intracelular, mediando assim, as diferentes fases da inflamação (Rankin,

2004; Majno & Joris, 2004, Kumar *et al.*, 2010; Serezani *et al.*, 2007; Serhan *et al.*, 2008, Harizi *et al.*, 2008).

Em relação à atuação desses metabólitos na resposta inflamatória, as prostaglandinas, incluindo a prostaglandina E_2 (PGE_2) (Serezani *et al.*, 2007) e as prostaciclinas causam vasodilatação e potencializam a formação do edema inflamatório (Cotran *et al.*, 1999; Majno & Joris, 2004; Aronoff *et al.*, 2007); os leucotrienos causam vasoconstricção, aumento de permeabilidade vascular e atuam como importantes agentes quimiotáticos, como por exemplo, o leucotrieno B_4 (Lewis *et al.*, 1990; Roitt *et al.*, 1999; Peters-Golden *et al.*, 2005; Peters-Golden & Henderson, 2007).

Adicionalmente, as lipoxinas, mediadores endógenos descritos primeiramente por Serhan e colaboradores (1984) atuam como importantes agentes anti-inflamatórios contribuindo para a resolução da resposta inflamatória tanto em humanos como em outros mamíferos (Fierro & Serhan, 2001; Serhan, 2005) A biossíntese das lipoxinas envolve a interação de diferentes tipos celulares, tais como leucócitos, plaquetas e endotélio vascular (McMahon *et al.*, 2001; Serhan, 2005).

As lipoxinas podem ser geradas mediante três vias distintas. Duas dessas vias envolvem a ação das enzimas: 12-LO de plaquetas, ou 15-LO de macrófagos que atuam sobre o leucotrieno A_4 (LTA_4) liberado por neutrófilos (Serhan & Sheppard, 1990; Levy *et al.*, 1993; Bonnans *et al.*, 2002). Recentemente, a terceira via de geração de lipoxinas foi descrita, e diferente das demais vias é desencadeada pela ação da aspirina (ASA), não havendo a participação das lipoxigenases. Sabe-se que a ASA é capaz de acetilar a ciclooxigenase-2 (COX-2) inibindo a geração de prostaglandina, mas também leva a formação de 15*R*-HETE, uma molécula intermediária que pode ser metabolizada pela 5-lipoxigenase. Dessa forma, essa enzima dá origem a epímeros (15*R*-LXs), também conhecidos como análogos estáveis de lipoxinas (ATLs), que contribuem para as propriedades anti-inflamatórias da ASA (Claria & Serhan;1995) .

A literatura descreve que a lipoxina A_4 inibe a liberação de IL-1β por neutrófilos, bem como a expressão de moléculas de adesão na superfície celular, o que conseqüentemente inibe a migração dessas células para o foco inflamatório (Moncada, 1991; Fiore & Serhan 1995; Diamond *et al.*, 1999; Fierro & Serhan, 2001) além de também estimular a fagocitose de neutrófilos apoptóticos por macrófagos (Godson *et al.*, 2000).

Ainda, cabe destacar, a ação moduladora das citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias que atuam nos eventos vasculares e celulares da resposta inflamatória.

O TNFα, IL-1, IL-6, IFN-γ, IL-12 e IL-18 são exemplos de citocinas pró-inflamatórias, enquanto a IL-4, IL-10, IL-13 e IFN-α são reconhecidas como anti-inflamatórias. (Cavaillon, 2001; Bogdan, 2001).

O TNF-α possui diversas propriedades biológicas, atuando sobre a diferenciação, proliferação, ativação e morte celular. Esta citocina exerce também efeito quimiotático sobre monócitos e neutrófilos, estimula a produção de prostaglandina E_2 por macrófagos residentes e modula a função de linfócitos B e T (Beutler & Cerami, 1989).

O TNF-α humano produzido pelos macrófagos, linfócitos T ativado e por outras células não linfóides é sintetizado em duas formas biologicamente ativas: uma forma precursora, associada à membrana, e uma solúvel, derivada da sua clivagem proteolítica (Smyth e Johnstone, 2000). Existem dois tipos de receptores para o TNF-α: tipo I (TNFR1) e tipo II (TNFR2), os quais estão presentes na membrana plasmática de vários tipos de células, com exceção dos eritrócitos (Wallace *et al.*, 1999; Shen & Pervaiz; 2006; Mazzon *et al.*, 2008).

A ligação ao receptor TNFR1 pode iniciar a clivagem e ativação das caspases, envolvidas no processo de apoptose. Alternativamente, a ativação do TNFR2 pode levar aos sinais intracelulares dependentes das quinases levando à ativação do fator NF-$_K$B e expressão de genes celulares para TNF-α (Warren *et al.*, 1988). Ainda, a ligação aos receptores pode resultar na ativação e proliferação celular (Smyth & Johnstone, 2000; Mazzon *et al.*, 2008).

A IL-1 (IL-1α e IL-1β) e a IL-6 são citocinas pleiotrópicas secretadas pelos macrófagos, monócitos, neutrófilos, linfócitos T e B, células endoteliais, fibroblastos e queratinócitos. Funcionalmente, são semelhantes e atuam sinergisticamente sobre diversas atividades biológicas; induzem principalmente a síntese e secreção de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos, sendo reconhecidas como reguladoras da resposta de fase aguda do processo inflamatório. Estas citocinas estimulam também a produção de quiomiocinas, as quais atraem as células inflamatórias para o sítio inflamatório (Dinarello, 1996; Sppörri *et. al.*, 2001).

O óxido nítrico (NO) é outro mediador importante, sintetizado por células (endoteliais, macrófagos e neurônios), pela ação das enzimas óxido nítrico sintetases

(NOSs) sobre a L-arginina e o oxigênio. Existem três isoformas descritas para a NOSs, duas delas, a forma neuronal (nNOS) e a endotelial (eNOS) são constitutivas, porém a outra é induzível (iNOS), como por exemplo, por LPS e citocinas (Moncada *et al.*, 1991; Alderton *et al.*, 2001; Cerqueira & Yoshida, 2002). O NO é um potente agente vasodilatador, que entre outras funções reduz a adesão e agregação de plaquetas e o recrutamento leucocitário durante a resposta inflamatória (Moncada *et al.*, 1991; Knowles & Moncada, 1995; Alderton *et al.*, 2001; Dusse *et al.*, 2003; Cerqueira & Yoshida, 2002; Kvietys & Granger, 2012).

Ainda nos eventos vasculares, deve ainda ser destacada a participação dos seguintes mediadores: os fragmentos C3a e C5a do sistema complemento; os fibrinopeptídeos, provenientes do sistema das cininas, aminas vasoativas, tais como a histamina e a serotonina, além do fator de ativação plaquetára (PAF) (Contran *et al.*, 1999; Rankin, 2004; Majno & Joris, 2004).

Além disso, o fragmento C5a do sistema complemento, os fibrionopeptídeos e o fator de ativação plaquetária (PAF) atuam como importantes agentes quimiotáticos.

O recrutamento de células para o foco inflamatório é um fenômeno fundamental na resposta inflamatória que envolve a interação específica e a conseqüente sinalização bidirecional entre as células endoteliais e os leucócitos (Muller, 2009). Essa interação é mediada por diversas famílias de moléculas de adesão e pela liberação de mediadores inflamatórios, tais como: citocinas (IL-1, TNF-α), quimiocinas (MCP-1, *macrophage inflammatory protein-1*), fragmentos do complemento (C5a), fator ativador das plaquetas e outros (Kumar *et al.*, 2010; Muller, 2009).

Cabe ressaltar que o processo de recrutamento leucocitário em direção ao foco inflamatório envolve uma série de eventos. Inicialmente, os leucócitos rolam sobre o endotélio vascular, em seguida aderem-se firmemente à superfície endotelial, o que aumenta de forma significativa o contato entre o leucócito e célula endotelial. Posteriormente, os leucócitos geralmente, se locomovem ao longo das junções inter-endoteliais e atravessam a membrana basal subendotelial alcançando o interstício e migram em direção ao foco inflamatório.

Cabe enfatizar que o modelo original da cascata de eventos responsáveis pela adesão e migração leucocitária era representado pelo *rolling*, mediado pelas selectinas e adesão mediada pelas integrinas, culminando com a transmigração dos leucócitos.

Entretanto, evidências recentes sugerem a adição dos seguintes eventos: *slow rolling*, firme adesão, *intraluminal crawling* e a migração celular propriamente dita (paracelular ou transcelular). A interação entre diferentes moléculas de adesão e seus respectivos ligantes permite que esses eventos ocorram de forma dinâmica no decorrer do processo inflamatório (Ley *et al.*, 2007; Zarbock & Ley, 2008; Muller 2009; Woodfin *et al.*, 2010).

1.2.2. Considerações gerais sobre moléculas de adesão

As moléculas de adesão podem ser encontradas na forma solúvel, como proteínas circulantes, ou ligadas à superfície das células (Fig. 2).

As selectinas consistem de três famílias diferentes de moléculas: L-selectina, P-selectina e E-selectina, as quais são importantes na captura dos leucócitos e no *rolling* sobre o endotélio (Ley *et al.*, 2007). A L-selectina (CD62L) é expressa, exclusiva e constitutivamente nos leucócitos, enquanto as expressões da E- selectina (CD62E), nas células endotelias, e da P-selectina (CD62P), tanto nas células endotelias como nas plaquetas, são induzidas por mediadores inflamatórios, tais como, TNF-α, IL-1 ou lipopolissacarídeos (Mulligan *et al.*, 1998; Walzog & Gaehtgens, 2000; Rankin, 2004; Mazzon *et al.*, 2008). Todas as selectinas possuem domínios que interagem com seus respectivos ligantes transmembrânicos de glicoproteínas, um componente terminal de oligossacarídeos presentes em leucócitos e em células endoteliais. Os ligantes ESL-1 (*E-selectin ligand-1*) ligam-se a E-selectina, já o PSGL-1 (*P-selectin glycoprotein ligand-1*) tem um papel importante como ligante para as três selectinas, apesar de originalmente ser classificado como um ligante apenas da P-selectina, enquanto que GlyCAM-1 (*Glycosylation dependent cell adhesion molecule-1*) e MadCAM (*Mucosal addressin cellular adhesion molecule-1*) ligam-se a L-selectina (Ebnet & Vestweber, 1999; Ley *et al.*, 2007; Woodfin *et al.*, 2010). A interação de leucócitos com as selectinas, juntamente com a participação de quimiocinas, pode induzir a ativação de integrinas na superfície leucocitária através de uma via de sinalização dependente de *mitogen activated protein kinases* (MAPK), levando a firme adesão dos leucócitos ao endotélio ativado.

As integrinas, moléculas de adesão presentes na superfície celular, são moléculas heterodiméricas, compostas por duas cadeias polipeptídicas α e β, unidas por

ligações não covalentes. A subunidade β determina a classificação dessas moléculas em: β_1 (CD29), β_2 (CD18), β_3 (CD61) e β_7 integrinas, as quais estão envolvidas no recrutamento dos leucócitos. Particularmente, as β_2 integrinas (CD11/CD18) também participam do *rolling* leucocitário e medeiam a firme adesão dos polimorfonucleares ao endotélio. Existem quatro tipos de β_2 integrinas, cujas denominações variam de acordo com as suas subunidades α: a LFA-1 (*lymphocyte function-associated antigen*); a Mac-1 (CD11b/CD18); a gp150/95 (CD11c/CD18) e a CD11d/CD18. Particularmente, a Mac-1 é armazenada em grânulos neutrofílicos. Diante da exposição da célula (neutrófilo) a fatores que estimulem sua desgranulação, como por exemplo, a secreção de IL-8, essa molécula é rapidamente mobilizada para a superfície celular. Estas integrinas ligam-se aos seus respectivos ligantes expressos pelas células endoteliais ativadas, pertencentes a famílias das imunoglobulinas (Ley *et al.*, 2007; Rose *et al.*, 2007; Zarbock & Ley 2008).

Dentre a superfamília das imunglobulinas destacam-se as ICAMs, 1, 2 e 3 (*intercellular adhesion molecule*) a VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule*-1) e a PECAM-1 (*platelet endothelial cell adhesion molecule-1*) ou CD31.

A ICAM-1, principal ligante envolvido na firme adesão dos polimorfonucleares ao endotélio liga-se as integrinas, LFA-1, Mac-1 e gp150/95. As ICAMs-2 e 3 ligam-se as integrinas LFA-1 e CD11d/CD18, respectivamente (Rankin 2004; Kinashi, 2005; Muller , 2009). Já a VCAM-1 é o ligante para a VLA-4 (*very late antigen-4*), uma β_1 integrina expressa principalmente nos linfócitos e nos monócitos.

A expressão dessas moléculas nas células é variada, a ICAM-1 e a VCAM-1 têm suas expressões aumentadas após ativação das células endoteliais pelos mediadores inflamatórios (IL-1, TNF, LPS) (Ley *et al*., 2007; Mazzon *et al.*, 2008), enquanto a ICAM-2 é expressa constitutivamente pelas células endoteliais e por alguns leucócitos, com exceção dos polimorfonucleares (Walzog & Gaehtgens, 2000; Rankin, 2004). Ainda, a PECAM-1 (*platelet endothelial cell adhesion molecule-1* ou CD31), outra molécula da família das imunoglobulinas é expressa nas plaquetas, polimorfonucleares, monócitos e nas junções intercelulares do endotélio (De Lisser *et al.*, 1994; Chosay *et al*., 1998;). A PECAM-1 dentre outras moléculas tais como as *junction adhesion molecules* (JAMs) e a CD99, é considerada uma molécula endotelial juncional intimamente ligada com o processo de transmigração endotelial (Ley *et al.*, 2007; Woodfin *et al.*, 2007; Privratsky *et al.*, 2010).

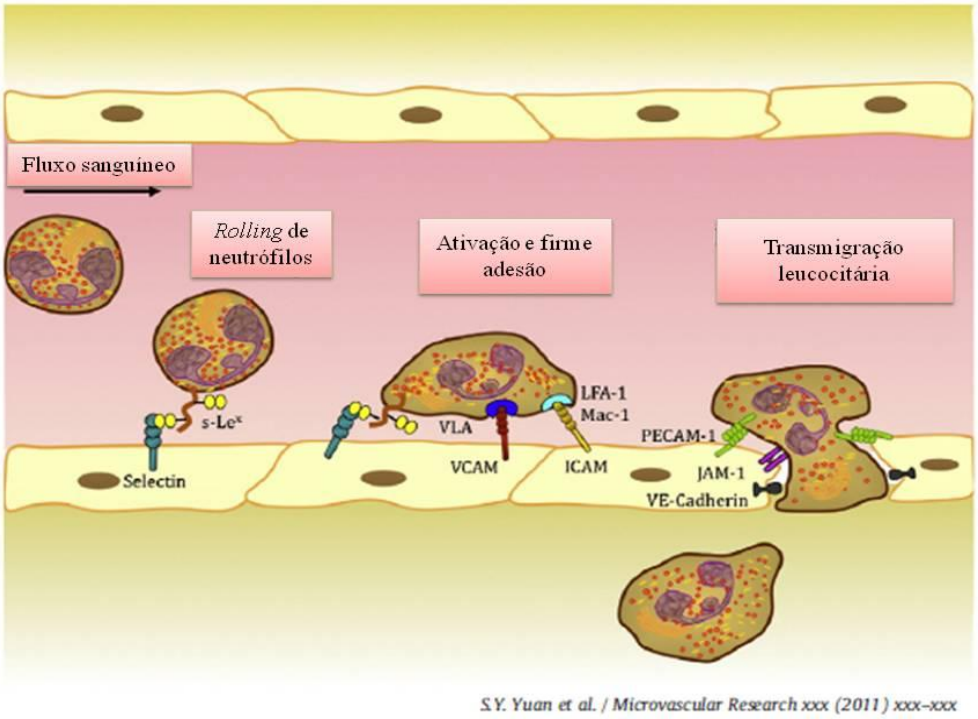


Figura 2. Representação esquemática das moléculas de adesão. Principais moléculas de adesão envolvidas na interação leucócito-endotélio e no recrutamento de leucócitos para o foco inflamatório. Destaque para o *rolling* mediado pelas selectinas, um pré-requisito para a ativação de integrinas-β_2, (LFA-1 e Mac-1) e consequente firme adesão de leucócitos sobre o endolélio vascular. Destaque também para as moléculas de adesão presentes nas junções inter-endoteliais (PECAM-1, JAM-1 e VE-caderina). A ativação e atuação dessas moléculas é essencial para o processo de transmigração leucocitária.

Além das moléculas descritas acima, também estão envolvidas no processo de transmigração dos leucócitos, as proteínas da matriz extracelular, expressas pelas células endoteliais nos locais de contato célula-célula, tais como, vitronectina (receptor para β_3 integrina) e caderina (Walzog & Gaehtgens, 2000).

Como citado anteriomente, a firme adesão de leucócitos ao endotélio envolve a expressão de integrinas que se ligam especificamente às imunoglobulinas presentes no endotélio vascular. Essa interação induz um aumento de cálcio intracelular e ativação de uma cascata de sinalização via MAPK, que culmina com uma atuação sobre os filamentos de miosina, induzindo a contração endotelial. Esses eventos promovem a

migração dos leucócitos por meio das junções inter-endoteliais, o que caracteriza a migração paracelular. Já a migração transcelular inicia mediante uma translocação de ICAM-1 para regiões ricas em cavéolas de actina. Essas cavéolas que passam a conter a ICAM-1 ligam-se a organelas vesículo-vacuolares (VVO), formando um canal por onde ocorre a passagem do leucócito. É importante destacar também a importância de um conjunto de proteínas denominado ERM (*ezrin, radixin* e *moensin*) responsáveis pelo aumento do link entre ICAM-1 e as proteínas do citoesqueleto (Ley *et al.*, 2007; Carman, 2009).

1.2.3. O fator de transcrição NF-κB

A literatura relata que a transcrição gênica de importantes mediadores envolvidos na gênese da resposta inflamatória, tais como COX-2, TNF-α e IL-1β é regulada pela ativação de um fator de transcrição nuclear, denominado NF-κB (nuclear factor-kappa B) (Hewett & Rott, 1993; Kopp & Ghosh, 1995; Watson *et al.*,1999; Kubes & McCafferty, 2000; Won *et al.*, 2006).

Em seu estado inativo os dímeros de NF-κB estão localizados no citoplasma como compostos inativos associados a membros da família dos inibidores de κB, IκB. Mediante um estímulo inflamatório, a enzima IκB quinase fosforila IκB, induzindo sua degradação, liberando o NF-κB que subsequentemente é translocado para o núcleo da célula. O NF-κB translocado (p65) no núcleo, liga-se ao sítio específico do DNA, favorecendo a transcrição de vários genes, cujas proteínas são importantes na resposta inflamatória, tais como: citocinas (TNF-α e IL-1β e IL-6) quimiocinas, moléculas de adesão e enzimas pró-inflamatórias (COX-2 e iNOS) (Arend & Dayer, 1995; Kopp & Ghosh, 1995; Barens & Karin, 1997; Kubes & McCafferty, 2000; Won *et al.*, 2006).

1.3. A carragenina como agente inflamatório

As carrageninas são polissacarídeos sulfatados provenientes de algas marinhas (*Rhodophycae*), predominantemente dos gêneros *Chondrus, Eucheuma, Gigartina* e *Iridaea* (Van Arman, 1979) e compreendem 3 subtipos κ, ι e λ (De Ruiter & Rudolph 1997). Essas substâncias são consideradas potentes aditivos alimentares. Além disso, modelos utilizando a carragenina (Cg) como agente inflamatório são amplamente utilizados tanto para a investigação da fisiopatologia da inflamação aguda, como

também para a triagem de substâncias com potencial anti-inflamatório (Winter *et al.*, 1962; Di Rosa, 1972; Vinegar *et al.*, 1982; Tsuji *et al.*, 2003; Bhattacharyya *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2011).

A inflamação induzida pela injeção de Cg em cavidades pleural e peritoneal é geralmente caracterizada por um acúmulo de exsudato e intensa migração de células inflamatórias. Da mesma forma, a injeção intraplantar desse agente inflamatório induz uma resposta inflamatória marcante com desenvolvimento de edema e hiperalgesia (Winter *et al.*, 1962; Nakamura & Ferreira, 1987; Posadas *et al.*, 2004).

Posadas e colaboradores (2004) demonstraram que em camundongos Swiss, o edema de pata induzido pela Cg é bifásico e dependente da idade e do peso dos animais. Além disso, esse edema é mediado pela expressão de eNOS, iNOS, COX-1 e COX-2. O primeiro pico de edema é caracterizado pelo aumento da expressão de óxido nítrico, enquanto que o segundo pico, mais tardio, difere do primeiro pelo aumento da expressão de COX-2, a qual começa a ser detectada a partir da 24ª hora após a injeção do agente.

Em relação ao componente celular da resposta inflamatória induzida pela Cg, Vinegar e colaboradores (1973) demonstraram por meio de análise histológica que a injeção intraplantar de Cg determina infiltração de neutrófilos no tecido subcutâneo da pata de ratos. Em relação à cinética de migração de neutrófilos, os mesmos autores observaram que após 20 minutos estas células localizavam-se em vasos próximos ao local da inoculação do agente. Após 60 minutos, observava-se a migração dessas células para o tecido subcutâneo adjacente, a qual se intensificava 2 horas após a injeção de Cg.

Em relação à mediação da resposta celular inflamatória induzida pela Cg, Wallace e colaboradores (1999) demonstraram através de modelo de bolsa de ar em ratos que a migração celular é mediada principalmente pela COX-1.

Outros dados de literatura relatam também que essa resposta celular envolve a participação de importantes mediadores pró-inflamatórios e de moléculas de adesão na migração celular induzida pela Cg, uma vez que foram detectados altos níveis de prostaglandina E_2, TNF-α, IL-1α e IL-1β, além de um aumento da expressão das moléculas de adesão P-selectina e ICAM-1 (Cuzzocrea *et al.*, 2006; Dalmarco *et al.*, 2008) 4 horas após a injeção desse agente inflamatório (Utsunomiya *et al.*, 1991; Cuzzocrea *et al.*, 1999; Fröde *et al.*, 2001; Iwata *et al.*, 2010; Min *et al.*, 2010).

1.4. Efeitos modulatórios do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (VCdt) e da crotoxina (CTX) sobre a resposta inflamatória

Ao contrário dos venenos de outras espécies pertencentes ao gênero *Crotalus*, como as encontradas na América Central e do Norte, a reação local gerada pela ação direta do veneno da espécie *Crotalus durissus terrificus* é caracterizada por um edema discreto sem sinais inflamatórios significativos (Amorim *et al.*, 1951).

Vários dados de literatura relatam que o VCdt e a sua principal toxina, a CTX apresentam efeitos imunomodulatórios, anti-inflamatórios e analgésicos (Landucci *et al.*, 1995; Cardoso & Mota 1997; Landucci *et al.*, 2000; Sousa-e-Silva *et al.*, 1996; Sampaio *et al.*, 2001; Nunes *et al.*, 2007, 2010; Zhu *et al.*, 2008).

Experimentalmente, Sousa-e-Silva e colaboradores (1996) demonstraram que o veneno crotálico desencadeia no local da inoculação uma resposta inflamatória caracterizada por discreto acúmulo de leucócitos polimorfonucleares e por edema de fraca intensidade, mediado principalmente pela histamina.

Além da fraca atividade flogística do VCdt, outras linhas de pesquisa evidenciam o papel modulador deste veneno sobre a resposta inflamatória. Landucci e colaboradores (1995, 2000) mostraram que o componente A da CTX (crotapotina), inibe o edema de pata de ratos induzido pela Cg ou por fosfolipases A_2 isoladas de venenos animais.

Sousa-e-Silva e colaboradores (1996) demonstraram que a injeção de VCdt em camundongos imediatamente após a administração intraperitoneal de tioglicolato, determina decréscimo no número de leucócitos que migram para a cavidade peritoneal. Ainda, os autores mostraram pela primeira vez que o VCdt inibe por um tempo prolongado o espraiamento e a capacidade de fagocitose por macrófagos peritoneais de camundongos, células relevantes no processo inflamatório.

Em continuidade a esse estudo, Sampaio e colaboradores (2001), avaliando o efeito do VCdt sobre o metabolismo de macrófagos peritoneais de ratos e a possível correlação entre as modificações deste metabolismo com as alterações funcionais destas células, demonstraram dualismo na ação deste veneno, uma vez que foi observada a estimulação do “burst”respiratório (geração de peróxido de hidrogênio), da geração de óxido nítrico, da atividade fungicida e do metabolismo de glicose e glutamina, como também foi observada a inibição do espraiamento e da capacidade fagocítica dessas células. Além disso, foi demonstrado que a CTX particularmente a fosfolipase A_2, o componente B desta toxina, é a responsável pela ação inibitória do veneno sobre as

funções dos macrófagos (Sampaio *et al.*, 2003; 2005). Outros estudos evidenciaram que os metabólitos do ácido araquidônico, derivados da lipoxigenase, estão envolvidos neste efeito (Sampaio *et al.*, 2006). Além disso, foi também demonstrado que essa atividade inibitória da toxina é decorrente da drástica diminuição da fosforilação de tirosina-quinase e da expressão de proteínas sinalizadoras como as GTPases, RhoA e Rac. (Sampaio *et al*., 2006)

Ainda, dentro dessa linha de investigação, foi demonstrado que, assim como observado para os macrófagos, o VCdt, *in vitro* e *in vivo*, inibe a fagocitose mediada por CR1/CR3, por neutrófilos peritoneais, obtidos no modelo de peritonite induzido pela Cg, em ratos. Nesse estudo foi observado também o efeito inibitório prolongado do VCdt, uma vez que esse efeito permanece por 14 dias após a administração de uma única dose de veneno (Lima *et al.*, 2007).

Dando continuidade aos estudos que evidenciam o efeito modulador do VCdt sobre a inflamação foi demonstrado ainda que o VCdt tem efeito antiinflamatório prolongado sobre a resposta inflamatória induzida pela Cg, em camundongos. Esse estudo mostrou que uma única dose de VCdt, administrada pela via subcutânea, 7 ou 21 dias antes da injeção de Cg inibe, respectivamente, o desenvolvimento do edema de pata e a migração celular para a cavidade peritoneal, induzidos por este agente inflamatório. Este efeito antiinflamatório também foi observado após a instalação da resposta inflamatória (Nunes *et al.*, 2007).

Além disso, foi identificado que a CTX, o principal componente do VCdt é responsável por esse efeito anti-inflamatório prolongado deste veneno. Neste mesmo trabalho, os autores demonstraram que uma única dose de CTX inibe o edema de pata e a migração de células para a cavidade peritoneal induzidos pela Cg, além de alterar a interação leucócito-endotélio induzida por esse agente inflamatório, ao reduzir a adesão dos leucócitos ao endotélio. Esse efeito envolve a ativação de receptores para lipoxina/anexina, tipo formil peptídeo, uma vez que a utilização de um antagonista desses receptores reverte o efeito inibitório da CTX (Nunes *et al.*, 2010).

Esses resultados corroboram com outros dados da literatura que indicam que o VCdt e a CTX induzem um aumento da produção da lipoxina A_4, importante mediador lipídico com potente ação anti-inflamatória, por macrófagos peritoneais (Sampaio *et al*., 2006).

Apesar dessas evidências, até o momento não foram investigados os mecanismos envolvidos no efeito anti-inflamatório da CTX. A relevância dessa investigação motivou o presente estudo.

Dessa forma, considerando a complexidade da resposta inflamatória é importante, caracterizar a ação da CTX sobre alguns parâmetros envolvidos na resposta inflamatória induzida pela Cg.

2. Objetivo

Caracterizar a ação anti-inflamatória da CTX enfocando, particularmente, sua ação sobre as moléculas de adesão e mediadores inflamatórios envolvidos na resposta inflamatória induzida pela Cg. Para tanto foram investigadas:

- a expressão de P-selectina, ICAM-1 e PECAM-1, no tecido subcutâneo do coxim plantar

- a expressão de Mac-1 (CD11b/CD18), nos leucócitos do exsudato peritoneal
- a secreção de citocinas pró-inflamatórias: TNF-α, IL-1β e IL-6 no exsudato peritoneal
- a secreção de PGE_2 e LTB_4 no exsudato peritoneal

3. Material e métodos

3.1. Animais

Para a realização deste estudo, foram utilizados camundongos Swiss, machos, pesando entre 18-22 g, fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan. Os animais foram mantidos com livre acesso a água e ração. Os protocolos experimentais foram realizados com aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUIB) (protocolos 637/09, 704/10 e 882/12).

3.2 Crotoxina

A purificação da fração CTX do veneno de *Crotalus durissus terrificus* foi realizada pela pesquisadora Dra. Maisa Splendore Della Casa do Laboratório de Imunopatologia do Instituto Butantan, pelo método descrito por Rangel-Santos e colaboradores (2004) modificado.

3.3. Agente inflamatório

Como agente inflamatório foi utilizada a carragenina (Cg) (Sigma Aldrich Company), o qual foi administrado no tecido subcutâneo do coxim plantar (15 mg/kg em 50 µL de salina estéril) ou na cavidade peritoneal (15 mg/kg em 200 µL de salina estéril) dos animais.

3.4. Planejamento geral

Durante o desenvolvimento deste estudo, foi investigado o efeito da CTX sobre a expressão de mediadores químicos pró-inflamatórios e de moléculas de adesão envolvidas na resposta inflamatória induzida pela Cg, em camundongos. Para tanto foram avaliados os efeitos do tratamento com a CTX sobre: a) secreção de citocinas pró-inflamatórias (TNF-α, IL-1β e IL-6), b) expressão de P-Selectina, ICAM-1, PECAM-1 e Mac-1 (CD11b/CD18), c) secreção de leucotrieno B_4 (LTB_4) e prostaglandina E_2 (PGE_2), d) expressão de COX-2, iNOS e p65.

3.5. Protocolo experimental

3.5.1. Tratamento com a Crotoxina

Uma única dose de CTX (44 µg/kg em 50 µL de salina estéril) foi administrada pela via subcutânea. O pré-tratamento foi realizado 1h, 7 ou 14 dias antes da injeção de Cg. Os grupos controles foram constituídos por animais tratados com os mesmos volumes de salina nas mesmas condições experimentais.

Cabe ressaltar que as concentrações da CTX utilizadas no presente estudo foram baseadas em trabalho anterior (Sousa-e-Silva *et al.*, 1996), e que a mesma não causa sinais clínicos de envenenamento nos animais, tais como ptose palpebral, fáscies miastênica e mioglobinúria, entre outros (Rosenfeld, 1971; Ministério da Saúde, 1998).

3.5.2 Resposta inflamatória induzida pela Cg

3.5.2.1. Obtenção do exsudato peritoneal induzido pela Cg

O exsudato peritoneal foi induzido pela injeção intraperitoneal (i.p.) de 200 µL de Cg (15 mg/kg) antes do tratamento com a CTX, como detalhado no protocolo experimental. Os animais do grupo controle foram tratados com o mesmo volume de salina (200 µL), nas mesmas condições experimentais. Após 4hs da injeção de Cg, os animais foram eutanasiados em câmara de CO_2, e a cavidade peritoneal foi lavada com 5 mL de tampão fosfato salina, pH 7,4 (PBS). Após a massagem do abdômen, as amostras de exsudato peritoneal foram coletadas, aliquotadas em tubos e armazenadas em freezer -70°C.

3.5.2.2. Obtenção dos cortes de tecido subcutâneo do coxim plantar

Após 30 minutos, 1 hora, 2 horas ou 4 horas da injeção intraplantar de Cg no tecido subcutâneo do coxim plantar, os animais foram eutanasiados em câmara de CO_2, e as patas imediatamente retiradas. O coxim plantar foi removido e fixado em Bouin para a análise histológica e, em Paraformaldeído 4% em tampão Millonig (pH=7,2;

0,1 M), para os ensaios de imunohistoquímica, como descrito abaixo.

3.5.3. Análise histológica

Para a análise histológica, o tecido subcutâneo do coxim plantar foi fixado em Bouin, por aproximadamente 8 horas. Após a fixação, o material foi desidratado em etanol, utilizando-se concentrações crescentes (70% a 100%), diafanizado em xilol e incluído em parafina. Após a inclusão, foram obtidos cortes transversais, com aproximadamente 5 µm de espessura, os quais foram posteriormente corados com hematoxilina e eosina (H/E).

Com o objetivo de se obter um preparado permanente, logo após a coloração, o material foi novamente desidratado, diafanizado e montado com Entellan® entre lâmina e lamínula. Para a análise histológica, as lâminas contendo os tecidos foram observadas e fotografadas em microscópio de luz DM LS (Leika) com captador de imagem DFC420 (Leika) e programa de imagem Leika Application Suite, versão 3.1.0.

3.5.4. Determinação da expressão de moléculas de adesão no tecido subcutâneo do coxim plantar de camundongos

3.5.4.1. Ensaios de Imunohistoquímica

As expressões das moléculas de adesão - P-selectina ICAM-1, e PECAM-1 - foram avaliadas 30 minutos, 1 hora ou 2 horas após a injeção intraplantar de Cg ou salina, por meio de imunohistoquímica. Após os diferentes tempos de administração da Cg, os animais foram eutanasiados, as suas patas foram cortadas e o coxim plantar foi retirado. Os coxins plantares foram então, imediatamente imersos em solução de Paraformaldeído 4% em tampão Millonig (pH=7,2; 0,1 M) onde permaneceram por aproximadamente 12 horas. Em seguida, o material foi desidratado em etanol, utilizando-se concentrações crescentes (70% a 100%), diafanizado em xilol e incluídos em parafina. Os cortes obtidos, com aproximadamente 5 µm de espessura, foram colhidos em lâminas silanizadas (3-aminopropil-trietoxi-silano), desparafinizados, reidratados em concentrações decrescentes de álcool etílico e lavados em água corrente.

A recuperação antigênica foi realizada utilizando-se calor úmido. Para tanto, os cortes histológicos foram mergulhados em uma cuba contendo tampão Tris (pH=7,6; 0,1 M) previamente aquecido a 96°C. Essa cuba foi colocada dentro de uma panela a

vapor onde permaneceu por 1 hora a 96° C. Em seguida, a cuba foi retirada da panela e permaneceu em temperatura ambiente para resfriamento.

Para o bloqueio de peroxidase endógena, os cortes foram incubados com peróxido de hidrogênio a 1% durante 30 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, com o objetivo de bloquear as reações inespecíficas, os cortes foram incubados com solução aquosa de BSA a 1% durante 30 minutos, em câmara úmida.

Após a lavagem em Tris-triton (0,01%), a reação seguiu com a incubação dos cortes com os diferentes anticorpos primários, em câmara úmida, a 4ºC "overnight". Os anticorpos primários utilizados foram: anti-P-selectina (Santa Cruz Biotechnology, diluição 1:100); anti-ICAM-1 (Santa Cruz Biotechnology, diluição 1:100) e anti-PECAM-1 (Santa Cruz Biotechnology, diluição 1:100), diluídos em Tris BSA a 0,05%.

Na seqüência, os cortes foram incubados durante 1 hora, em câmara úmida a 37ºC, com os anticorpos secundários conjugados com peroxidase, e anti-IgG de cabra (Sigma Aldrich Company, diluição 1:500) para os anticorpos anti-P-selectina, anti-ICAM-1, e anti-PECAM-1. Posteriormente foi realizada a revelação da reação com uma solução contendo Tris-HCl (pH= 7,6; 0,1M), peróxido de hidrogênio a 30% e 3,3 diaminobenzidine (DAB, Sigma Aldrich Company).

Após a revelação, os cortes foram contracorados em Hematoxilina de Harris, desidratados e montados em resina sintética (Entellan). Como controle negativo, o anticorpo primário foi substituído por BSA a 0,05%. Já como controle positivo, foram utilizados cortes de tecido de animais injetado com Cg, e pré-tratados com salina pela via subcutânea. Para a análise da imunomarcação, as lâminas contendo os tecidos foram observadas e fotografadas em microscópio de luz DM LS (Leika), com captador de imagem DFC420 (Leika) e programa de imagem Leika Application Suite, versão 3.1.0.

3.5.5. Determinação da expressão de Mac-1 em leucócitos presentes no exsudato peritoneal

3.5.5.1. Citometria de fluxo

A expressão da molécula de adesão, Mac-1 foi avaliada pela técnica de citometria de fluxo. Como descrito no item 3.5.2.1. o exsudato peritoneal foi obtido 4 horas após a injeção i.p. de Cg ou salina. A suspensão de células peritoneais foi

incubada com solução de hemólise (150 mM NH_4CL, 10 mM $NaHCO_3$ e 0,1 mM EDTA; pH= 7,4) por 5 minutos à 4°C. Após a hemólise, a suspensão de células foi diluída na proporção de 1:2 (v:v) com líquido de Turk e a contagem total de células foi feita em Hemocitômetro de Neubauer. Amostras do exsudato peritoneal contendo $1x10^6$ células/mL (95% de neutrófilos) foram incubadas por 30 minutos a 4°C com anticorpo conjugado com FITC (isotiocianato de fluorescína), anti-MAC-1 (BD Bioscience, 2 µg/50µL). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas e os sobrenadantes desprezados. Os sedimentos celulares foram ressuspensos em PBS, fixados em Paraformaldeído 0,1% e analisados em Citômetro de fluxo FACSCanto II (BD Bioscience) utilizando o programa FlowJo (BD Bioscience). Como controle negativo, foi avaliada a fluorescência das células na ausência do anticorpo ou na presença de anticorpo isotípico (IgG2b).

3.5.6. Determinação dos mediadores inflamatórios presentes no exsudato peritoneal

3.5.6.1. Dosagem de citocinas

Os níveis de IL-1β, TNF-α e IL-6 no exsudato peritoneal foram determinados pela técnica de ELISA utilizando-se kits reagentes (R&D System). Alíquotas de 100µL do anticorpo de captura específico foram adicionadas à placa de 96 poços e incubadas a 4°C *overnight*. Após esse tempo, foi feita a aspiração da suspensão e a lavagem da placa com tampão de lavagem (PBS 0,05% Tween-20), por 5 vezes. Posteriormente, a placa foi bloqueada com 200 µL da solução de bloqueio (BSA 1%) e incubada por 1 hora em temperatura ambiente. Na seqüência, foram adicionados 100 µL das amostras (exsudato peritoneal, item 3.5.2.1.) em cada poço, e a placa foi então incubada por um período de 2 horas em temperatura ambiente. Como etapa seguinte, após sucessivas lavagens, foram adicionados 100 µL do anticorpo específico de detecção em cada poço e a placa então foi novamente incubada por 2 horas em temperatura ambiente. Após esse período, foi feita a retirada do excesso do anticorpo de detecção e lavagens sucessivas da placa com tampão de lavagem. Sendo assim, 100 µL da diluição de trabalho (1/200) de Streptoavidina-HRP foi aplicada por poço, e a placa foi incubada por 20 minutos em temperatura ambiente. Na sequência foram adicionados 100 µL de solução substrato

(10 mg de OPD + 10 µL de H_2O_2+10 mL de tampão citrato) e após 30 minutos a reação foi bloqueada com solução STOP (2N H_2SO_4). No período de 30 minutos a absorbância das amostras foi determinada em leitor de ELISA (Spectra MAX 190, Molecular Devices), em comprimento de onda de 450 nm e as concentrações foram estimadas utilizando-se uma curva padrão específica com concentrações em pg/mL (2000-31 pg/mL).

3.5.6.2. Dosagem de leucotrieno B_4 e prostaglandina E_2

O exsudato peritoneal foi obtido como descrito no item 3.5.2.1., as dosagens de LTB_4 e PGE_2, foram determinadas pela técnica de ELISA, utilizando-se kits reagentes (R&D System), seguindo as recomendações especificadas pelo fabricante. Alíquotas contendo 50 µL (LTB_4) ou 150 µL (PGE_2) das amostras de exsudato foram adicionadas às placas de 96 poços e incubadas com 50 µL de anticorpo primário específico em temperatura ambiente, por 1 hora. Após esse tempo, foram acrescentados em cada poço 50 µL do anticorpo específico conjugado com peroxidase. As placas foram mantidas sob agitação em temperatura ambiente por um período de 2 horas (LTB_4) ou 3 horas (PGE_2). Posteriormente, foi feita a aspiração da suspensão e a lavagem da placa com tampão de lavagem (PBS 0,05% Tween-20) por 4 vezes. Após a adição do substrato, a placa foi mantida à temperatura ambiente em local escuro e, após 30 minutos, a reação foi bloqueada com solução STOP (2N H_2SO_4). No período de 30 minutos, a absorbância das amostras foi determinada em leitor de ELISA (Spectra MAX 190, Molecular Devices), em comprimento de onda de 450 nm e as concentrações foram estimadas utilizando-se uma curva padrão específica com concentrações em pg/mL (PGE_2: 2500-39 pg/mL; LTB_4: 2500-10 pg/mL).

3.5.7. Determinação da expressão de iNOS e de p65 no tecido subcutâneo do coxim plantar após a injeção de Cg

A expressão de iNOS ou p65 foram avaliadas pela técnica de Western blotting segundo Posadas e colaboradores (2004) modificado . Os fragmentos das patas obtidos 4 horas após a injeção de Cg (item 3.5.2) foram homogeneizados em tampão RIPA (50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1% Triton-X, 1% Deoxicolato de sódio e 0,1% de SDS), com o auxílio de um homogeinizador (Politron). O material foi

centrifugado e a concentração protéica do sobrenadante foi determinada pelo método do ácido bicinconínico (BCA) (Smith *et al.*, 1985). As concentrações das amostras foram ajustadas para 50 µg de proteína com tampão de amostra contendo 2-Mercaptoetanol. As proteínas contidas em tampão de amostra (Laemmli, 1980) (SDS 20%; glicerina; β-mercaptoetanol 1 M; tampão Tris 1 M pH 6.8; azul de bromofenol 0,1%) foram aquecidas previamente a 100°C, por aproximadamente 7 minutos, e separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 10%. Para tanto, foi aplicada uma voltagem constante de 15 mA/ gel. Posteriormente, as bandas proteicas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, com uma voltagem de 15V, durante 2 horas. Os sítios inespecíficos da membrana de nitrocelulose foram bloqueados por uma solução contendo leite desnatado a 5% em tampão de lavagem (10% Tween-20, pH 7.4), *overnight*. Para a detecção de iNOS ou p65, as membranas foram incubadas com anticorpo policlonal anti-iNOS (Sigma Aldrich Company, diluição 1:10000) e p65 (Abcam, diluição 1:500), durante 2 horas. Em seguida, foi adicionado um segundo anticorpo, conjugado à peroxidase, para a detecção (anti- IgG de coelho, diluição 1:200) (Sigma Aldrich Company). Para o controle do *western blotting*, as membranas foram incubadas também com o anticorpo monoclonal anti-GAPDH (Sigma Aldrich Company, diluição 1:10000).

Para obtenção dos resultados após os ensaios, as membranas de nitrocelulose foram escaneadas e as análises densitométricas das bandas foram realizadas utilizando o programa TotalLab TL100 (Estados Unidos). Os valores relativos às unidades arbitrárias de cada amostra foram obtidos pela relação entre: a marcação da banda de interesse obtida após a revelação com 3,3-Diaminobenzidine (DAB Sigma Aldrich Company), e a quantidade de proteína total da amostra (obtida pela coloração da membrana, com Ponceau), ou seja, banda/Ponceau, considerando o valor relativo 1(um) para as amostras do grupo injetado com Cg na cavidade peritoneal.

3.5.8. Avaliação da participação de glicocorticóides endógenos no efeito anti-inflamatório da CTX sobre a migração celular induzida pela Cg

3.5.8.1. Tratamento com Mifepristone® (RU 486) ou Metirapona®

Uma única dose de Mifepristone® ou RU-486 (Sigma Aldrich Company), (antagonista de receptor de corticosterona) (50 mg/kg) ou de Metirapona® (25 mg/kg) (inibidor da síntese de glicocorticóide) foi administrada pela via subcutânea dos animais, 30 minutos antes da injeção de CTX. O tratamento com a CTX foi realizado conforme descrito no item 3.5.1. 1 hora ou 7 dias antes da administração i.p da Cg. Após 4 horas da injeção de Cg, o exsudato peritoneal foi obtido conforme descrito no item 3.5.2.1.

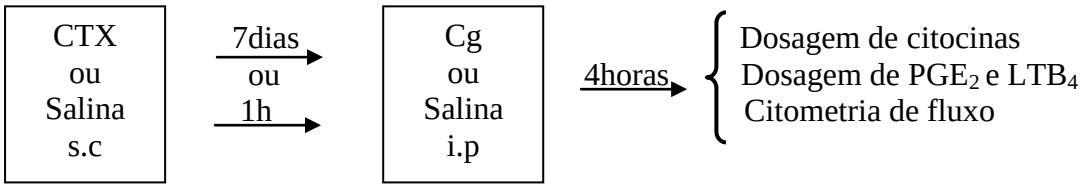
A suspensão de células peritoneais foi diluída na proporção 1:2 (v:v) com líquido de Turk e a contagem de células foi determinada em câmara de Neubauer. A contagem diferencial foi realizada em esfregaços corados pelo método pancrômico de Rosenfeld (Rosenfeld, 1947). Um total de 100 células foi contado por microscopia de luz, utilizando-se objetiva de imersão.

3.6. Análises estatísticas

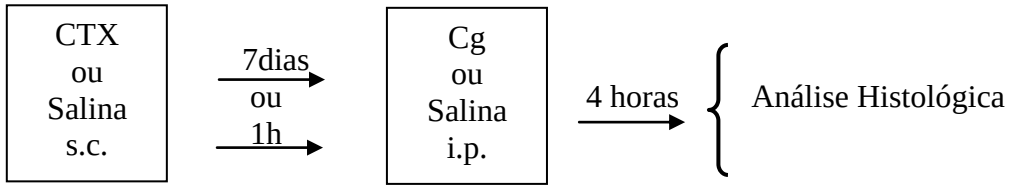
Os resultados foram expressos como média ± S.E.M. Para análise estatística, foi realizado o teste ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey. Diferenças com $p<0.05$ (5%) foram consideradas estatisticamente significantes.

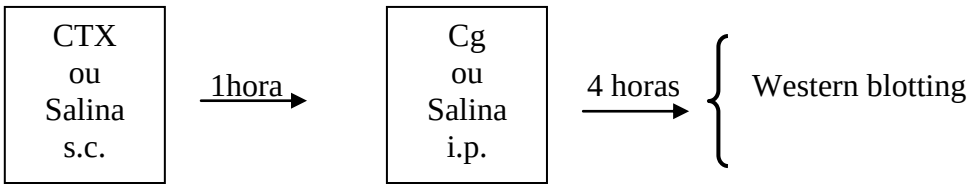
3.7. Quadro Sinótico

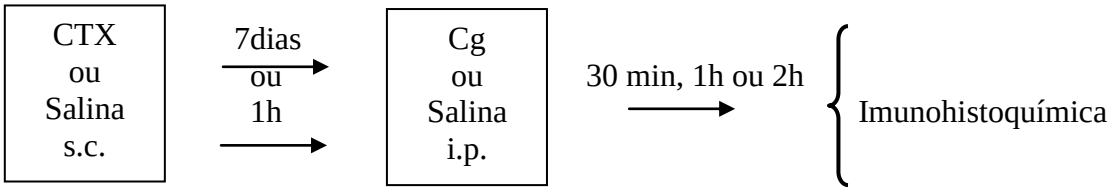
Modelo de migração celular para a cavidade peritoneal



Modelo de migração celular para o tecido subcutâneo do coxim plantar







4. RESULTADOS

4.1. Migração celular induzida por Cg para o tecido subcutâneo do coxim plantar

Diferente do que foi observado nas análises histológicas do tecido subcutâneo dos animais do grupo Salina+Salina, onde é possível observar uma preservação tecidual e ausência de polimorfonucleares no tecido conjuntivo (Fig. 3), a análise histológica do tecido subcutâneo, dos animais do grupo Salina+Cg, mostraram uma marcante reação inflamatória caracterizada por edema, com conseqüente desestruturação do tecido conjuntivo, e por intenso infiltrado inflamatório constituído pelo aumento de leucócitos, principalmente de polimorfonucleares, que invadem o tecido muscular, (Figs. 4A, A1 e A2 e Figs. 5A, A1 e A2).

4.2. Efeito da CTX sobre a migração celular, induzida pela Cg, para o tecido subcutâneo do coxim plantar

Os resultados mostraram que os animais tratados com a CTX 7 dias ou 1 h antes da injeção intraplantar de Cg (15 mg/kg) apresentaram uma redução das áreas edematogênicas e do infiltrado inflamatório. Além disso, em ambos os tempos, foi possível observar uma maior preservação da estrutura do tecido conjuntivo, quando comparados com os animais do grupo Salina+Cg (Figs. 4B e 5B).

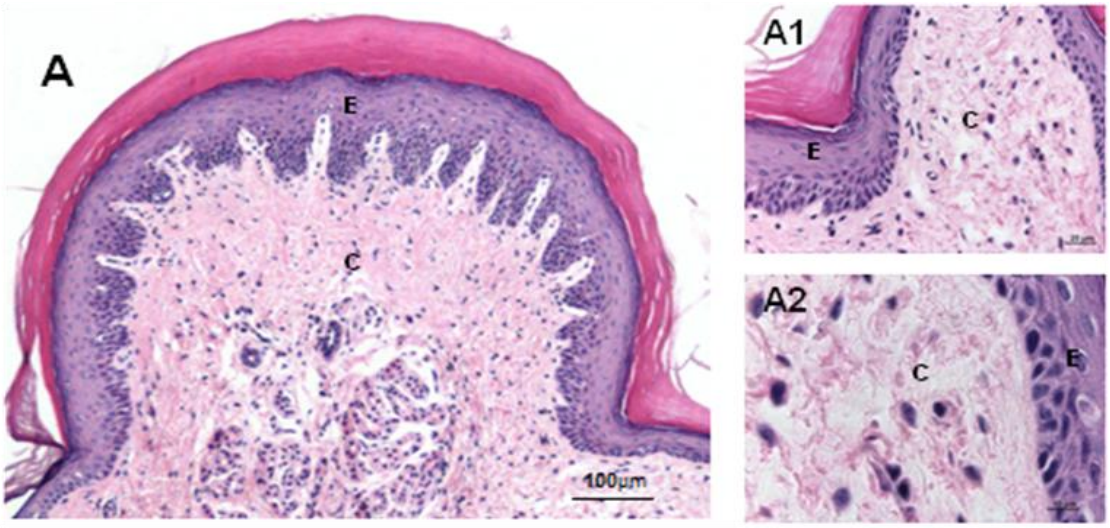


Figura 3. Coxim plantar de camundongos pertencentes ao grupo Salina+Salina, 4 horas após a injeção intraplantar de Salina – (A) - Fotomicrografia de parte da epiderme constituída por várias camadas de células epiteliais (E) e parte da derme (C) com as papilas dérmicas penetrando na epiderme (barra= 100 µm). A1 – Detalhe do tecido conjuntivo (C), onde é possível observar a preservação tecidual, com arranjo típico das fibras colágenas e presença principalmente de fibroblastos (barra= 25µm).
A2 – Detalhe do tecido conjuntivo onde é possível notar ausência de infiltrado inflamatório (barra= 10µm). H/E.

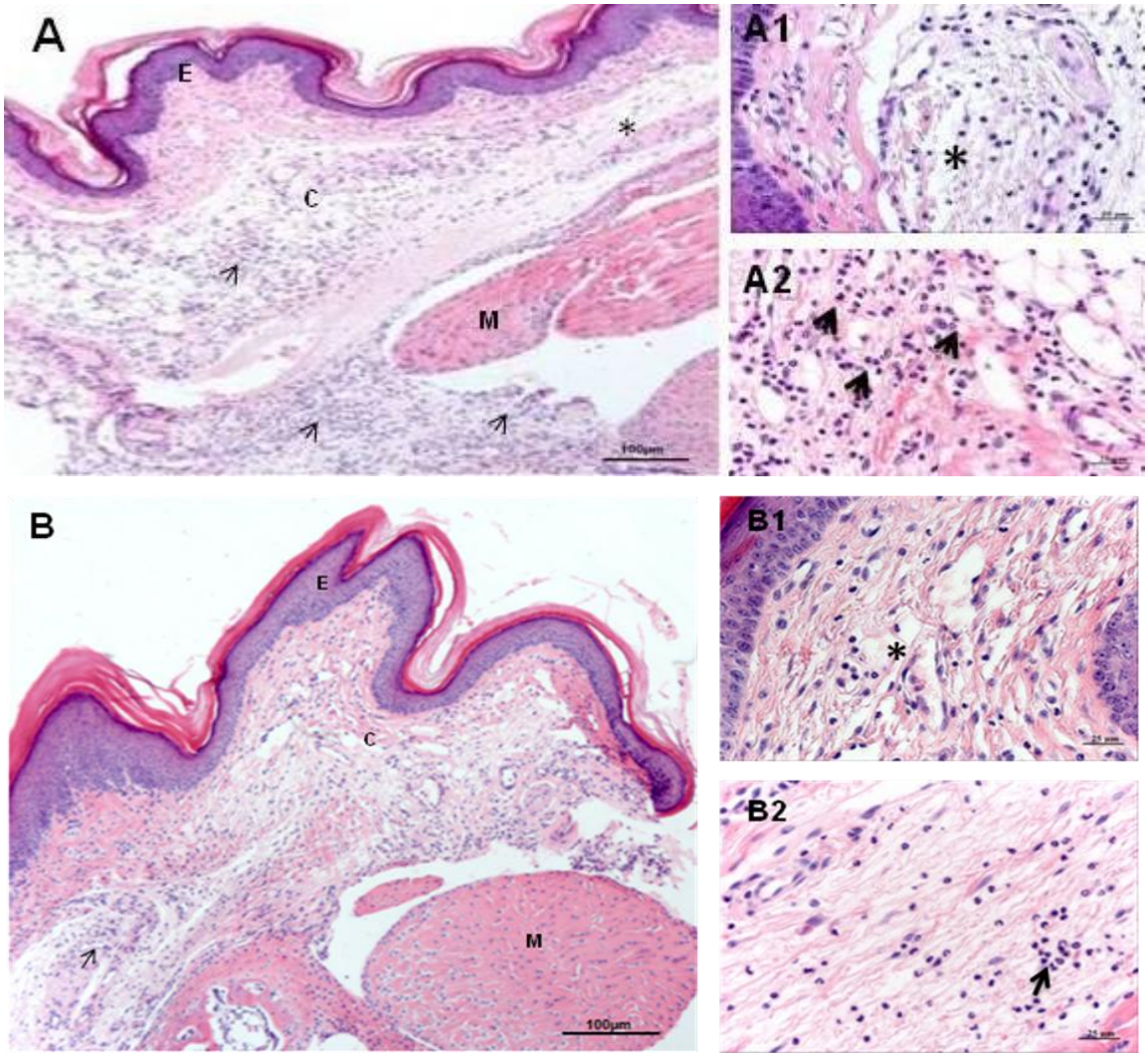


Figura 4. Coxim plantar de camundongos. (A) – Fotomicrografia do coxim plantar de animais do grupo experimental Salina+ Cg, 4 horas após a injeção intraplantar de Cg (15mg/kg). A e B - Vista geral de parte do epitélio (E), tecido conjuntivo (C) e tecido muscular (M) (barra=100 µm). A1 – Detalhe do tecido conjuntivo onde é possível observar áreas edematogênicas (*) (barra= 25µm). A2 – Detalhe do tecido conjuntivo onde é possível notar marcante infiltrado inflamatório (setas) (barra= 25µm). H/E. (B) - Fotomicrografia do coxim plantar de animais pré-tratados com a CTX (44 µg/kg) 1 hora antes da injeção intraplantar de Cg (CTX + Cg). Após 4 horas da injeção do agente inflamatório, vista geral de parte do epitélio (E), tecido conjuntivo (C) e tecido muscular (M). B1 – Detalhe do tecido conjuntivo onde é possível observar diminuição das áreas edematogênicas (*) (25µm). B2 – Detalhe do tecido conjuntivo onde é possível notar discreto infiltrado inflamatório (setas) (barra= 25µm). H/E.

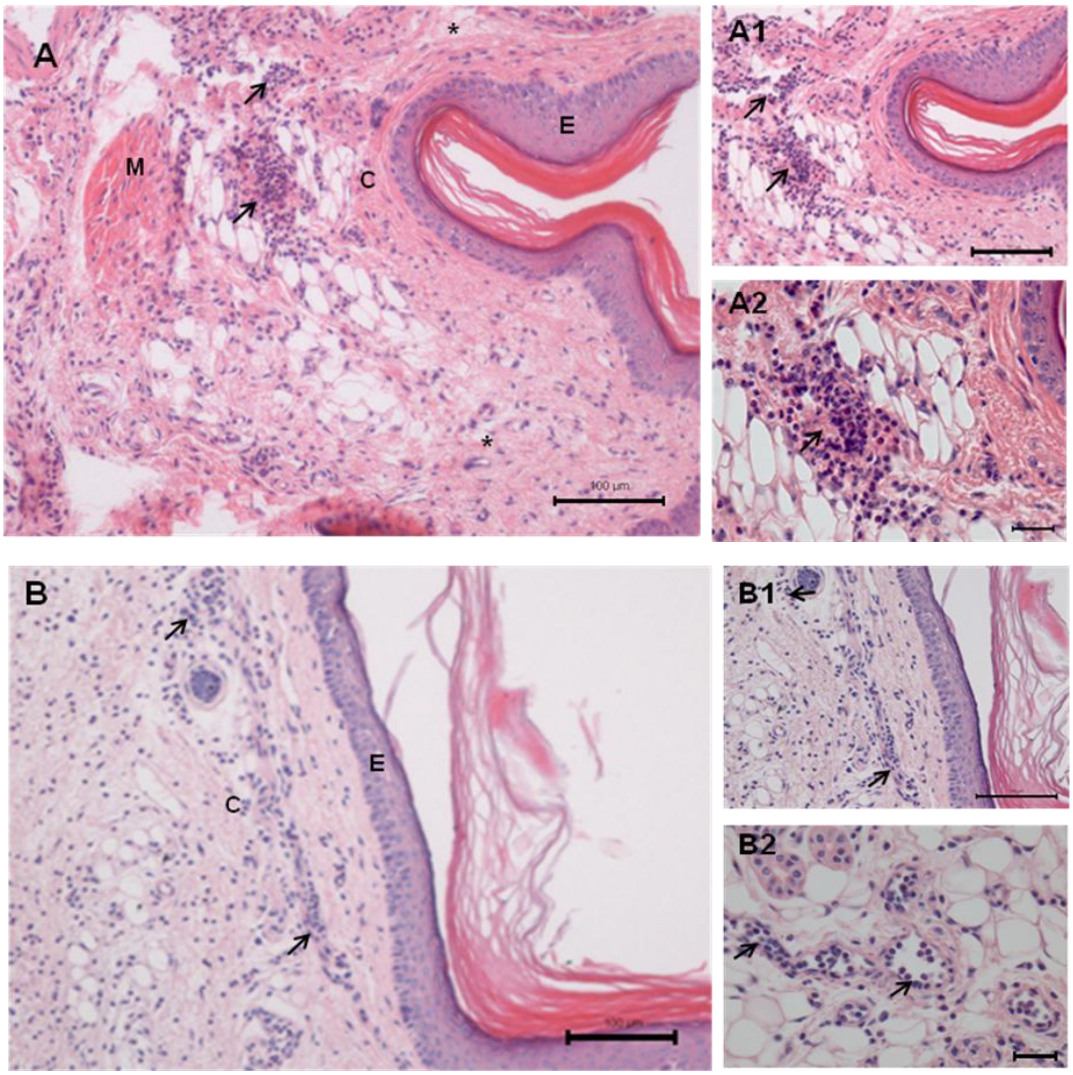


Figura 5. Coxim plantar de camundongos. (A) – Fotomicrografia do coxim plantar de animais do grupo experimental Salina+ Cg, 4 horas após a injeção intraplantar de Cg (15mg/kg). A e B - Vista geral de parte do epitélio (E), tecido conjuntivo (C) e tecido muscular (M) (barra= 100µm). A1 – Detalhe do tecido conjuntivo onde é possível observar áreas edematogênicas (barra= 25µm). A2 – Detalhe do tecido conjuntivo onde é possível notar intenso infiltrado inflamatório (setas) (barra=10µm). H/E. (B) - Fotomicrografia do coxim plantar de animais pré-tratados com a CTX (44 µg/kg), 7 dias antes da injeção intraplantar de Cg (CTX + Cg). Após 4 horas da injeção do agente inflamatório, vista geral de parte do epitélio (E), tecido conjuntivo (C). B1– Detalhe do tecido conjuntivo onde é possível observar diminuição das áreas edematogênicas quando comparado com a fotomicrografia B2 (barra= 10µm). B2 – Detalhe do tecido conjuntivo onde é possível notar diminuição da presença de infiltrado inflamatório (setas) (10µm). H/E.

4.3. Avaliação da expressão de P-selectina, ICAM-1 e PECAM-1 induzida pela Cg no endotélio vascular do tecido subcutâneo

As expressões de P-selectina, ICAM-1 e PECAM-1 induzidas pela Cg foram avaliadas 30 minutos e 1 hora após a injeção de Cg, por meio de ensaios de imunohistoquímica.

As Figs 6A e 8A mostram que 30 minutos após a injeção intraplantar de Cg, observa-se imunomarcação positiva de P-selectina no endotélio dos vasos sanguíneos. Essa marcação também foi observada 1 hora após a injeção desse agente (Figs. 7A e 9A).

Em relação à ICAM-1, diferentemente da P-selectina, os dados mostraram que a expressão dessa molécula, ou seja, a marcação positiva no endotélio dos vasos, somente foi observada 1 h após a injeção de Cg (Figs 10A e 11A). Sendo assim, em relação à expressão de ICAM-1, apenas o material coletado 1 hora após a injeção intraplantar de Cg foi utilizado nos ensaios de imunohistoquímica.

Já a marcação positiva de PECAM-1 foi observada no endotélio dos vasos sanguíneos, 30 minutos após a injeção intraplantar de Cg. Essa marcação positiva foi também observada 1 h e 2 horas após a injeção do agente inflamatório (Figs 12, 13 e 14).

4.3.1. Efeito da CTX sobre a expressão das moléculas de adesão P-selectina, ICAM-1 e PECAM-1, no endotélio vascular do tecido subcutâneo induzida pela Cg

Os resultados dos ensaios de imunohistoquímica mostraram que os animais pré-tratados com a CTX 1 h (Figs 6B e 7B) ou 7 dias (Figs 8B e 9B), antes da injeção intraplantar de Cg, apresentaram uma redução intensa na marcação positiva da P-selectina no endotélio vascular do tecido subcutâneo, quando comparados ao grupo não tratado (Salina+Cg). Essa redução foi observada 30 minutos (Figs 6B e 8B) ou 1 h (Figs 7B e 9B), após a indução da inflamação pela injeção de Cg.

Da mesma forma, no tecido subcutâneo coletado 1 h após a injeção intraplantar de Cg, foi observada uma redução na marcação de ICAM-1, no endotélio dos vasos sanguíneos, nos animais tratados com a CTX 1 h ou 7 dias antes da administração da Cg (Figs. 10B e 11B).

Diferente do que foi observado com a P-selectina e com a ICAM-1, não houve diferença na marcação de PECAM-1, no endotélio vascular dos animais pré-tratados com a CTX 1 h ou 7 dias antes da injeção intraplantar de Cg, quando comparado aos animais tratados com salina (Salina+Cg) (Figs. 12, 13 e 14).

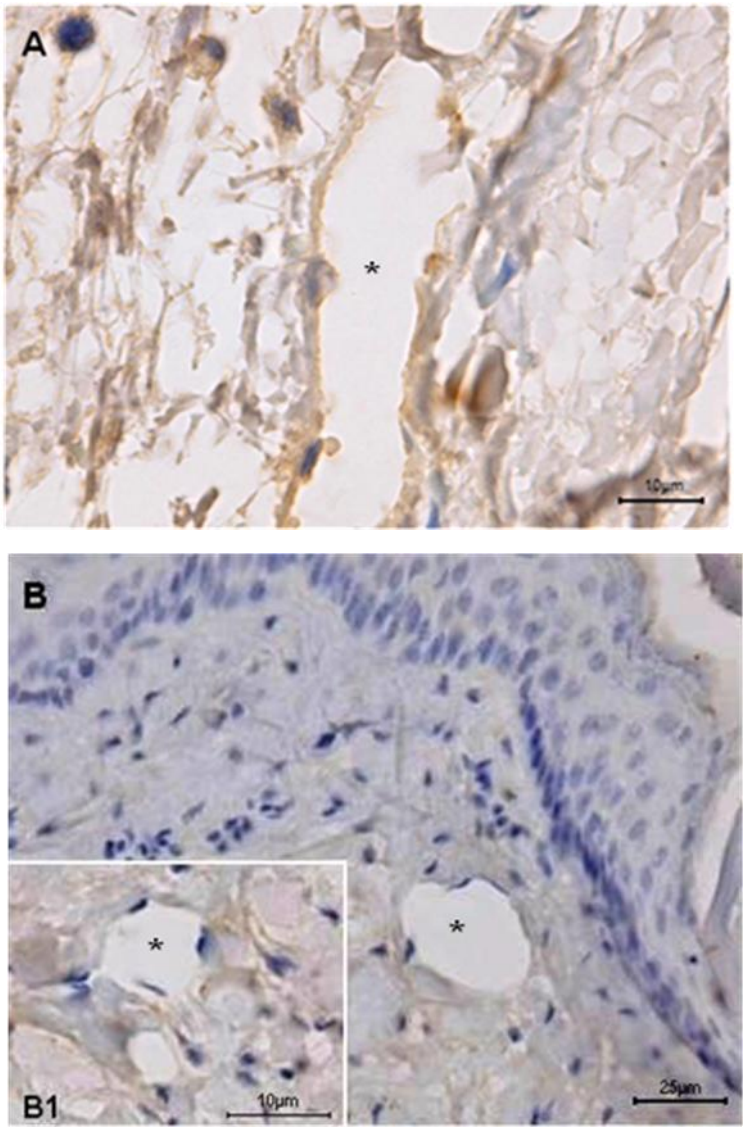


Figura 6: Marcação por imunohistoquímica de P-Selectina, no tecido subcutâneo do coxim plantar. Cortes obtidos de patas de animais dos grupos experimentais Salina+Cg (A) (barra= 10µm) e CTX+Cg (B e B1) (barras= 25µm e 10µm), 30 minutos após a injeção de Cg. Os animais foram tratados com Salina (50 µL) ou CTX pela via subcutânea 1 hora antes da injeção intraplantar de Cg (15 mg/kg). Figuras representativas de 5 animais por grupo. (*) – Vaso sanguíneo. A- Presença de imunomarcação positiva na parede do vaso (coloração castanha) B- Ausência de imunomarcação positiva na parede do vaso.

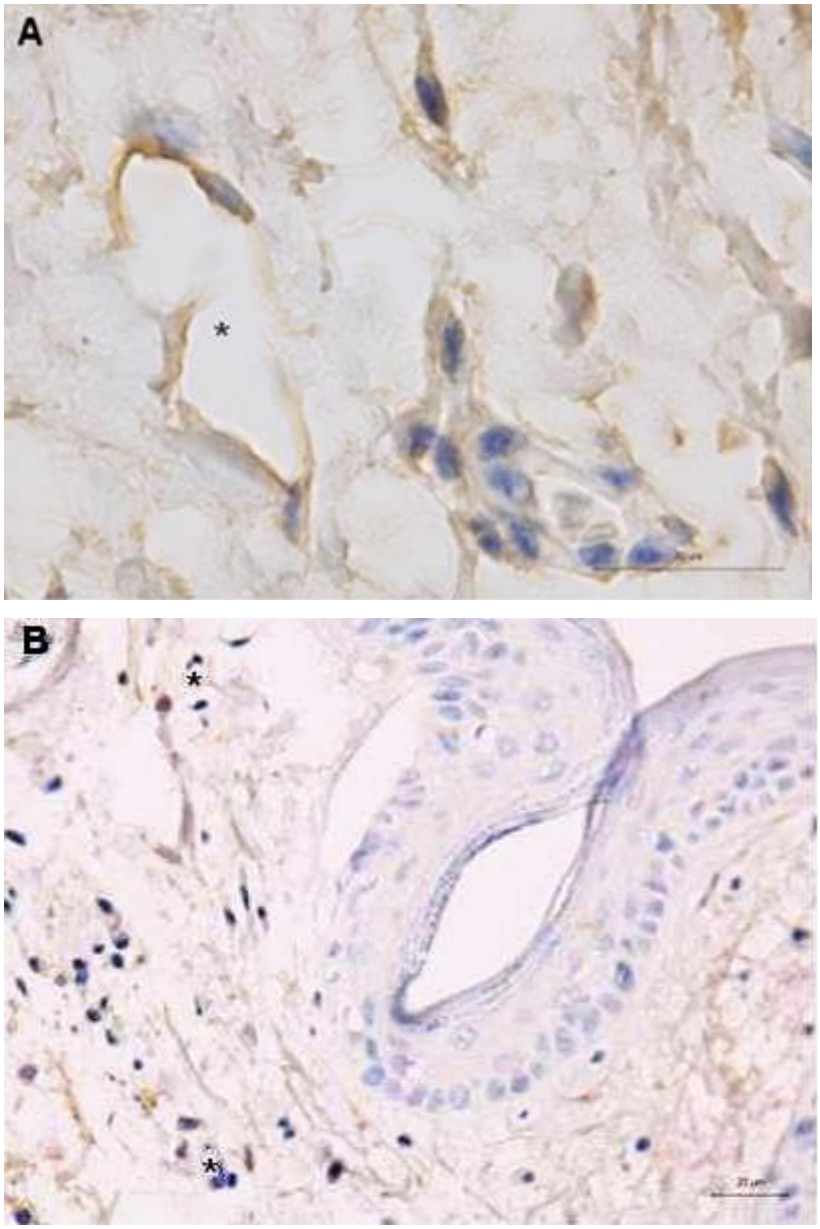


Figura 7: Marcação por imunohistoquímica de P-Selectina no tecido subcutâneo do coxim plantar. Cortes obtidos de patas de animais dos grupos experimentais Salina+Cg (A) (barra= 10µm) e CTX+Cg (B) (barra= 25µm), 1 hora após a injeção de Cg. Os animais foram tratados com Salina (50 µL) ou CTX pela via subcutânea, 1 hora antes da injeção intraplantar de Cg (15 mg/kg). Figuras representativas de 5 animais por grupo. (*) – Vaso sanguíneo A - Presença de imunomarcação positiva na parede do vaso (coloração castanha). B- Ausência de imunomarcação positiva na parede do vaso.

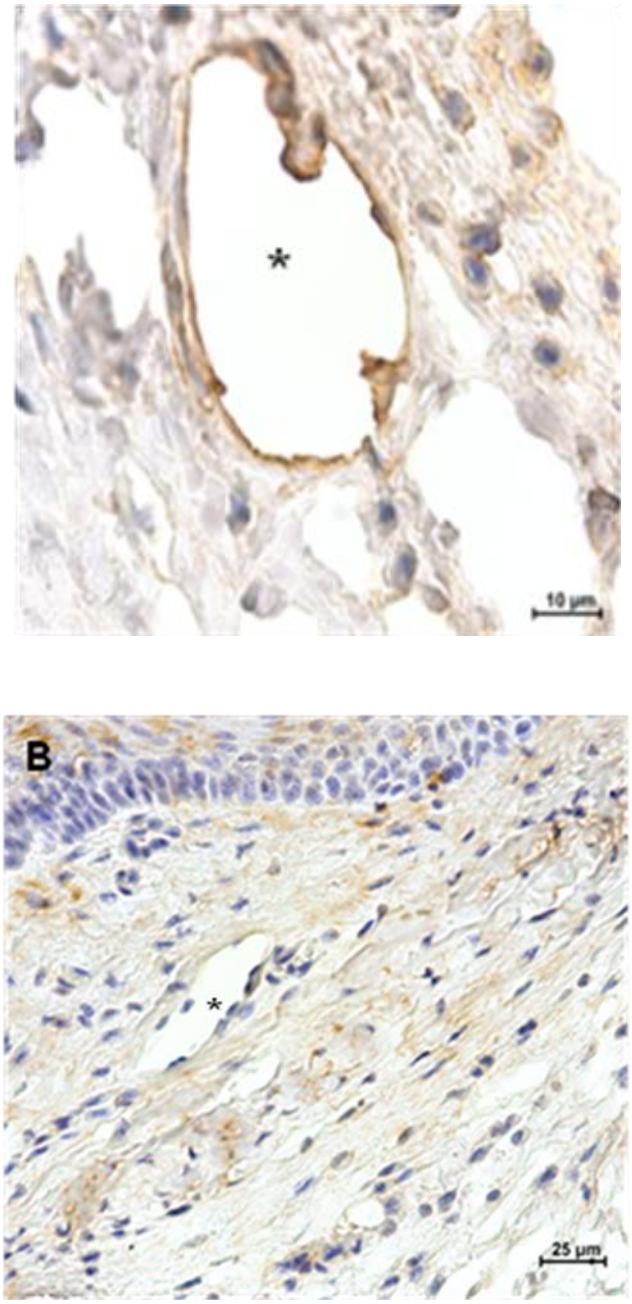


Figura 8. Marcação por imunohistoquímica de P-Selectina no tecido subcutâneo do coxim plantar. Cortes obtidos de patas de animais dos grupos experimentais Salina+Cg (A) (barra= 10µm) e CTX+Cg (B) (barra= 25µm), 30 minutos após a injeção de Cg. Os animais foram tratados com Salina (50 µL) ou CTX pela via subcutânea 7 dias antes da injeção intraplantar de Cg (15 mg/kg). Figuras representativas de 5 animais por grupo. (*) – Vaso sanguíneo A - Presença de imunomarcação positiva na parede do vaso (coloração castanha). B- Ausência de imunomarcação positiva na parede do vaso.

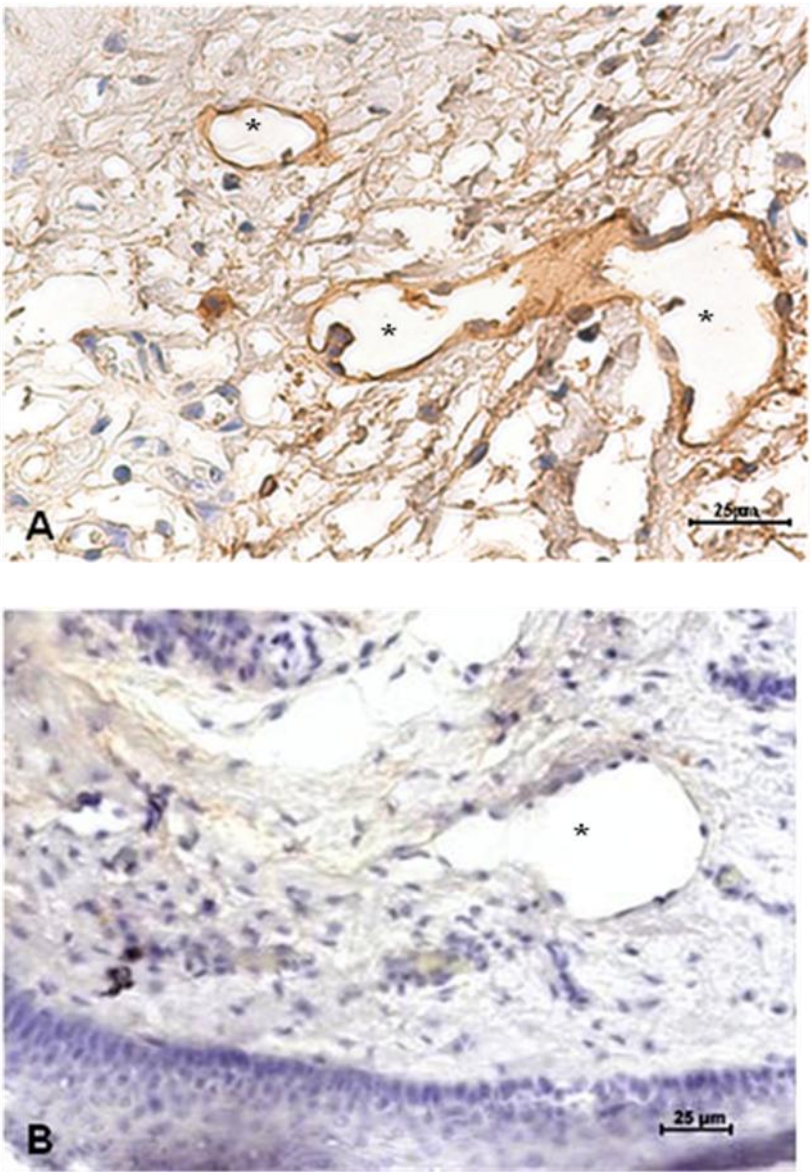


Figura 9. Marcação por imunohistoquímica de P-Selectina no tecido subcutâneo do coxim plantar. Cortes obtidos de patas de animais dos grupos experimentais Salina+Cg (A) (barra= 25µm) e CTX+Cg (B) (barra= 25µm), 1 hora após a injeção de Cg. Os animais foram tratados com Salina (50 µL) ou CTX pela via subcutânea 7 dias antes da injeção intraplantar de Cg (15 mg/kg). Figuras representativas de 5 animais por grupo. (*) – Vaso sanguíneo. A - Presença de imunomarcação positiva na parede do vaso (coloração castanha). B- Ausência de imunomarcação positiva na parede do vaso.

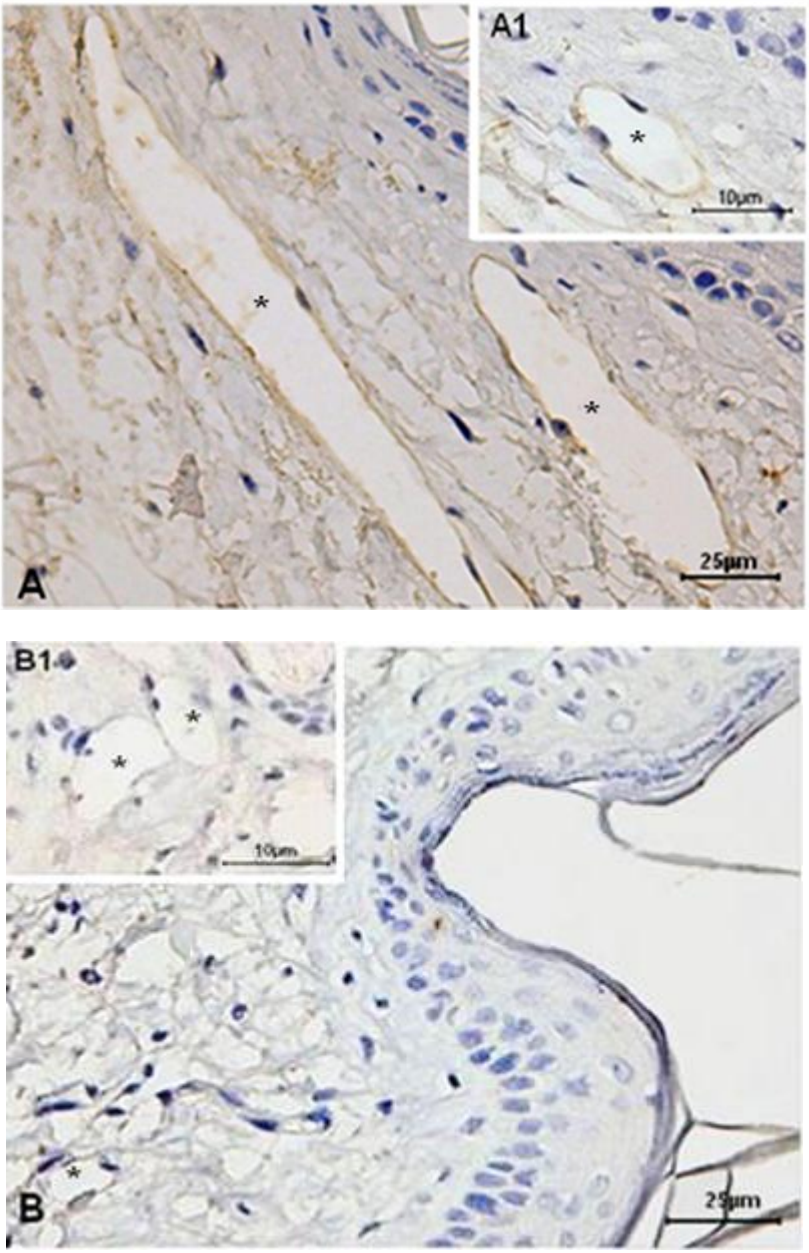


Figura 10. Marcação por imunohistoquímica de ICAM-1 no tecido subcutâneo do coxim plantar. Cortes obtidos de patas de animais dos grupos experimentais Salina+Cg (A e A1) (barras= 25µm e 10µm) e CTX+Cg (B e B1) (25µm e 10µm), 1 hora após a injeção de Cg. Os animais foram tratados com Salina (50 µL) ou CTX pela via subcutânea 1 hora antes da injeção intraplantar de Cg (15 mg/kg). Figuras representativas de 5 animais por grupo. (*) – Vaso sanguíneo. A - Presença de imunomarcação positiva na parede do vaso (coloração castanha). B- Ausência de imunomarcação positiva na parede do vaso.

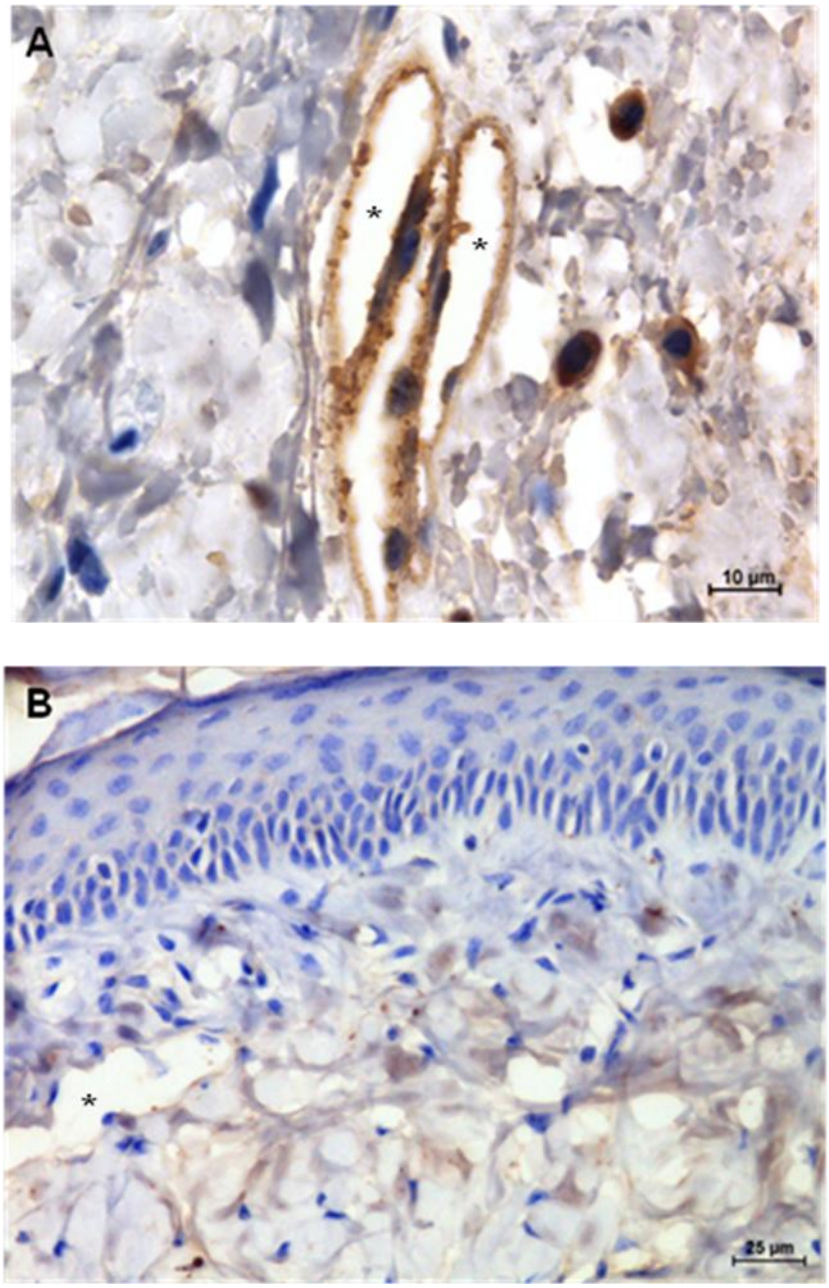


Figura 11. Marcação por imunohistoquímica de ICAM-1 no tecido subcutâneo do coxim plantar. Cortes obtidos de patas de animais dos grupos experimentais Salina+Cg (A) (10µm) e CTX+Cg (B) (25µm), 1 hora após a injeção de Cg. Os animais foram tratados com Salina (50 µL) ou CTX pela via subcutânea 7 dias antes da injeção intraplantar de Cg (15 mg/kg). Figuras representativas de 5 animais por grupo. (*) – Vaso sanguíneo. A - Presença de imunomarcação positiva na parede do vaso (coloração castanha). B- Ausência de imunomarcação positiva na parede do vaso.

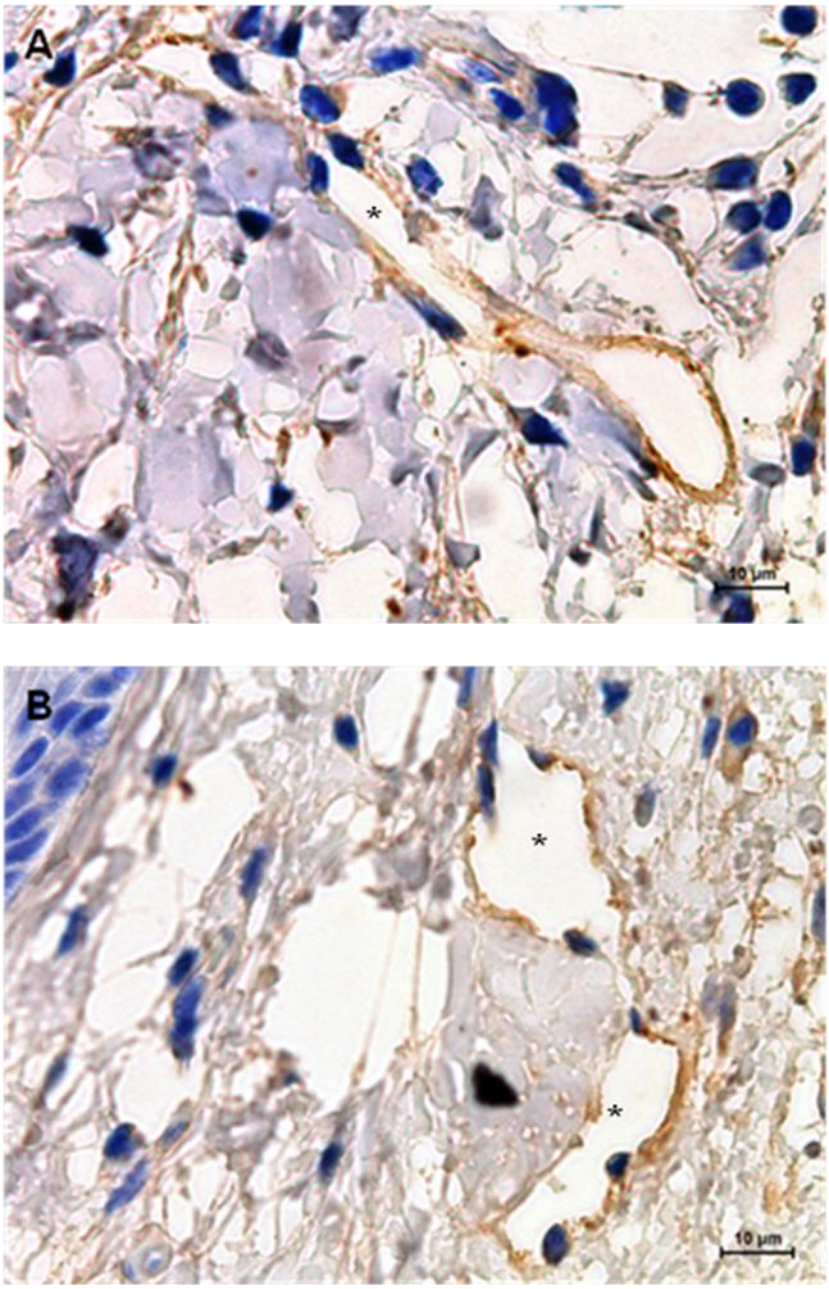


Figura 12. Marcação por imunohistoquímica de PECAM-1 no tecido subcutâneo do coxim plantar. Cortes obtidos de patas de animais dos grupos experimentais Salina+Cg (A) (10µm) e CTX+Cg (B) (10µm), 30 minutos após a injeção de Cg. Os animais foram tratados com Salina (50 µL) ou CTX pela via subcutânea 1 hora antes da injeção intraplantar de Cg (15 mg/kg). Figuras representativas de 5 animais por grupo. (*) – Vaso sanguíneo. A e B - Presença de imunomarcação positiva na parede do vaso (coloração castanha).

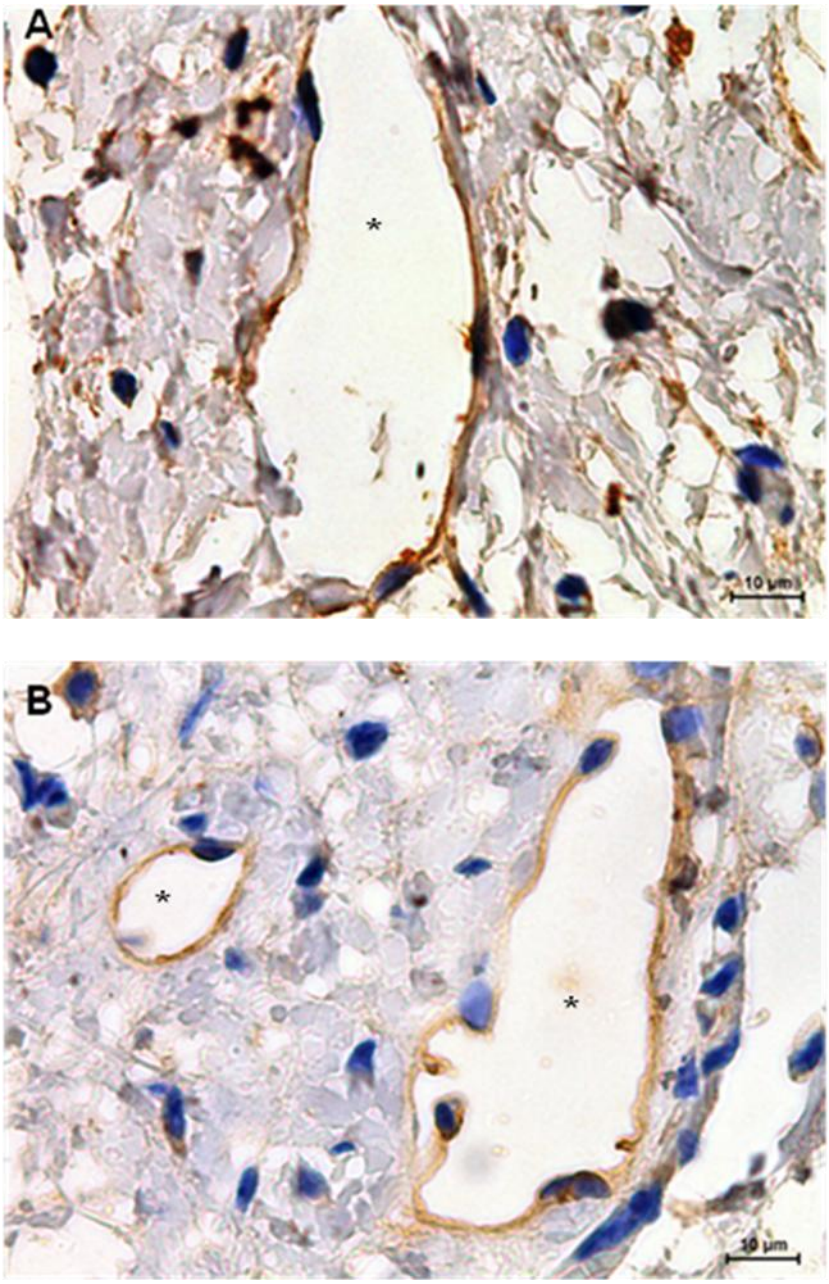


Figura 13. Marcação por imunohistoquímica de PECAM-1 no tecido subcutâneo do coxim plantar. Cortes obtidos de patas de animais dos grupos experimentais Salina+Cg (A) (barra=10µm) e CTX+Cg (B) (barra=10µm), 1 hora após a injeção de Cg. Os animais foram tratados com Salina (50 µL) ou CTX pela via subcutânea 1 hora antes da injeção intraplantar de Cg (15 mg/kg). Figuras representativas de 5 animais por grupo. (*) – Vaso sanguíneo. A e B - Presença de imunomarcação positiva na parede do vaso (coloração castanha).

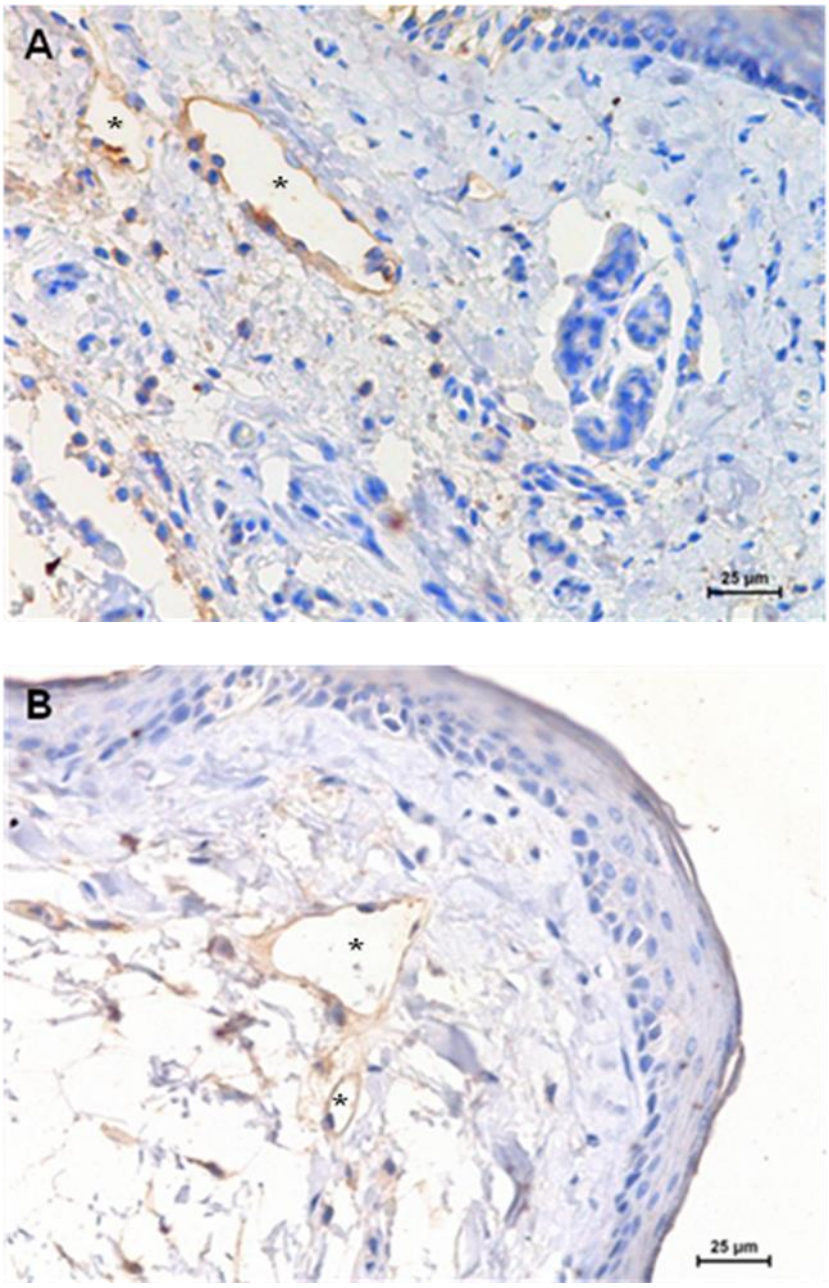


Figura 14. Marcação por imunohistoquímica de PECAM-1 no tecido subcutâneo do coxim plantar. Cortes obtidos de patas de animais dos grupos experimentais Salina+Cg (A) (barra=25µm) e CTX+Cg (B) (barra=25µm), 2 horas após a injeção de Cg. Os animais foram tratados com Salina (50 µL) ou CTX pela via subcutânea 1 hora antes da injeção intraplantar de Cg (15 mg/kg). Figuras representativas de 5 animais por grupo. (*) – Vaso sanguíneo. A e B - Presença de imunomarcação positiva na parede do vaso (coloração castanha).

4.4. Determinação da expressão de CD11b/CD18 (Mac-1) em leucócitos presentes no exsudato peritoneal

A expresão de CD11b/CD18 (Mac-1) induzida pela Cg foi determinada por citometria de fluxo .

Os nossos resultados mostraram que não foi observada diferença significante entre a expressão de Mac-1 em leucócitos dos animais do grupo Salina+Cg quando comparada a expressão de Mac-1 em leucócitos dos animais do grupo Salina+Salina.

4.4.1. Efeito da CTX sobre a expressão de CD11b/CD18 (Mac-1) em leucócitos presentes no exsudato peritoneal

Em relação ao tratamento com a CTX, não foi observada diferença significante entre a expressão de Mac-1 em leucócitos dos animais CTX+Cg quando comparada a expressão dessa molécula de adesão em leucócitos dos animais pertencentes aos demais grupos experimentais (Salina+Salina, CTX+Salina e CTX+Cg) (Fig. 15).

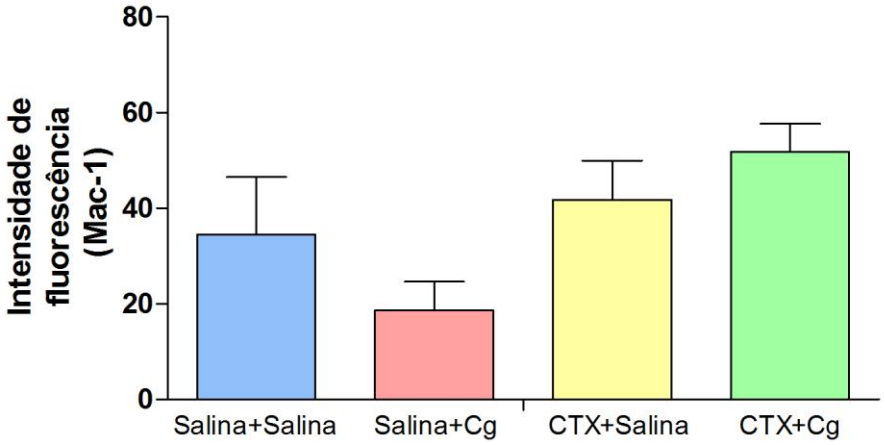


Figura 15. Efeito da CTX sobre a expressão de Mac-1 (CD11b/CD18) em leucócitos de exsudato peritoneal de camundongos. A expressão de Mac-1 foi determinada por Citometria de Fluxo. Os animais foram tratados com uma única dose de CTX (44µg/kg) ou salina (50 µL), 1 hora antes da injeção intraperitoneal de Cg (15 mg/kg) ou salina (200 µL). Após 4 horas da injeção i.p., as amostras de exsudato peritoneal foram coletadas. Amostras contendo $1x10^6$ de células foram utilizadas para a determinação da expressão de Mac-1. Os resultados expressam a média ± e.p.m. da medida de intensidade de fluorescência de 5 animais por grupo.

4.5. Determinação da secreção de TNF-α, IL-1β e 1L-6 induzida pela Cg no exsudato peritoneal

Quatro horas após a injeção intraperitoneal de Cg, foi observado, no exsudato peritoneal de animais do grupo Salina+Cg, um aumento significante da secreção de TNF-α, IL-1β e IL-6, quando comparado ao grupo de animais que foram administrados com salina intraperitoneal (Salina+Salina) Esse aumento foi de 100%, 91% e 93% para TNF-α, IL-1β e IL-6, respectivamente. (Figs 16, 17 e 18).

4.5.1. Efeito da CTX sobre a secreção de citocinas: TNF-α, IL-1β e IL-6

Os resultados demonstraram que o pré-tratamento com CTX, 1 hora ou 7 dias antes da injeção de Cg, reduziu de maneira significante as concentrações de TNF-α, (Figs. 16 e 19), IL-1β (Figs. 17 e 20) e IL-6 (Figs. 18 e 21) em relação aos respectivos grupos controles, tratados com salina (Salina+Cg).

Em relação à secreção de TNF-α, a redução foi de 92% e 55% nos animais pré-tratados com CTX 1 hora (Fig. 16) e 7 dias (Fig. 19) antes da injeção intraperitoneal de Cg, respectivamente. Já a redução da secreção de IL-1β foi de 71% e 63% nos animais pré-tratados com CTX, 1 hora (Fig. 17) e 7 dias (Fig. 20), respectivamente. Enquanto que em relação à secreção de IL-6 a redução foi de 50% para o grupo de animais que receberam o pré-tratamento de 1 hora (Fig. 18) e 62% para o pré-tratamento de 7 dias (Fig. 21) com a CTX, quando comparados ao grupo controle tratado com salina (Salina+Cg). Além disso, os resultados mostraram ainda uma redução significante da secreção de IL-1β e IL-6 nos animais pré-tratados com CTX 14 dias antes da injeção intraperitoneal de Cg, quando comparados aos animais tratados com salina (Salina+Cg). A redução foi de 50% e 30%, para IL-1β (Fig. 22) e IL-6 (Fig. 23), respectivamente.

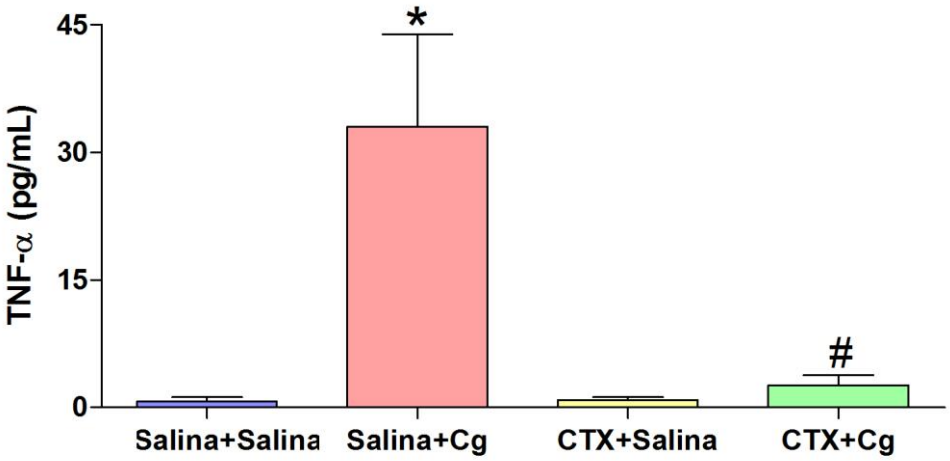


Figura 16. Efeito da CTX sobre a secreção de TNF-α em exsudato peritoneal de camundongos. A concentração de TNF-α foi determinada por ELISA. Os animais foram tratados com uma única dose de CTX (44 µg/kg) ou salina (50 µL), 1 hora antes da injeção intraperitoneal de Cg (15 mg/kg) ou salina (200 µL). Após 4 horas da injeção i.p., as amostras de exsudato peritoneal foram coletadas. Amostras de exsudato peritoneal de diferentes grupos de tratamentos (Salina+Salina; Salina+Cg; CTX+Salina; CTX+Cg), foram utilizadas para a determinação da concentração da citocina. Os resultados expressam a média ± e.p.m. de pelo menos 5 animais por grupo.*$p<0.05$ estatisticamente diferente do grupo Salina+Salina; # $p<0.05$ estatisticamente diferente dos grupos Salina+Salina e Salina+Cg.

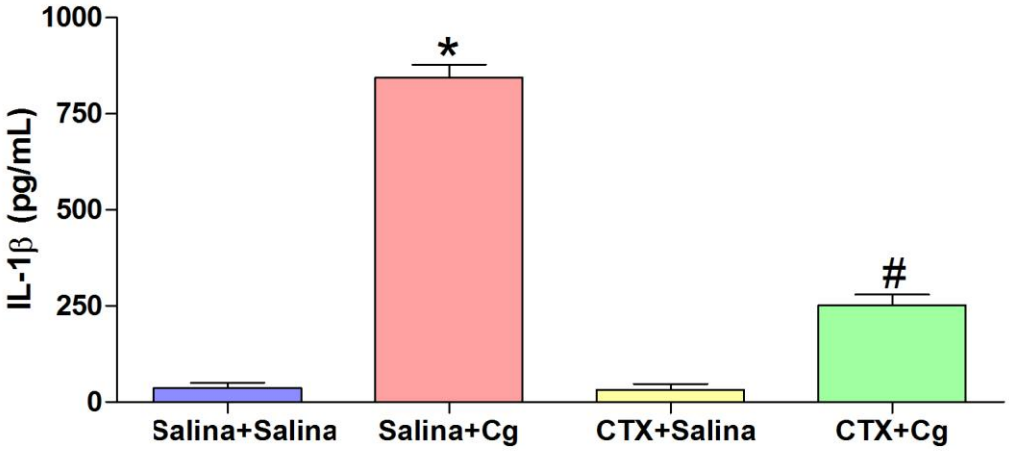


Figura 17. Efeito da CTX sobre a secreção de IL-1β em exsudato peritoneal de camundongos. A concentração da IL-1β foi determinada por ELISA. Os animais foram tratados com uma única dose de CTX (44 µg/kg) ou salina (50 µL), 1 hora antes da injeção intraperitoneal de Cg (15 mg/kg) ou salina (200 µL). Após 4 horas da injeção i.p., as amostras de exsudato peritoneal foram coletadas. Amostras de exsudato peritoneal de diferentes grupos de tratamentos (Salina+Salina; Salina+Cg; CTX+Salina; CTX+Cg) foram utilizadas para a determinação da concentração da citocina. Os resultados expressam a média ± e.p.m. de pelo menos 5 animais por grupo.*$p<0.05$ estatisticamente diferente do grupo Salina+Salina; # $p<0.05$ estatisticamente diferente dos grupos Salina+Salina e Salina+Cg.

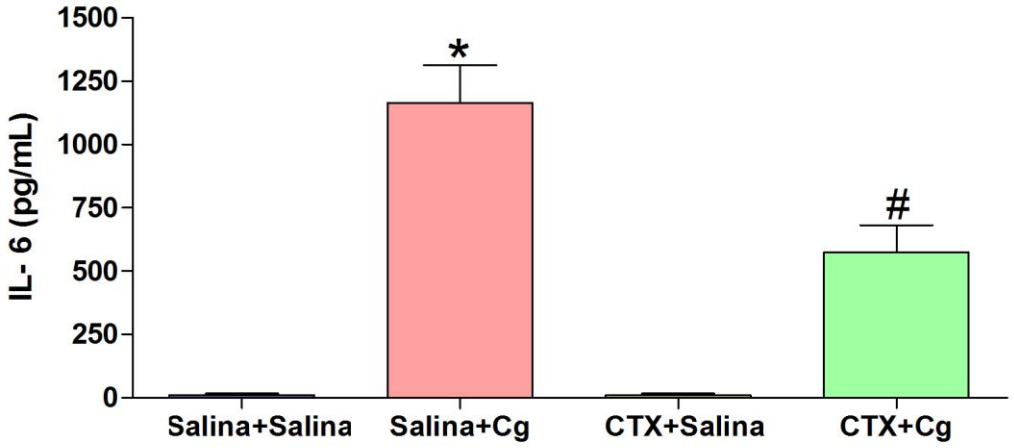


Figura 18. Efeito da CTX sobre a secreção de IL-6 em exsudato peritoneal de camundongos. A concentração da IL-6 foi determinada por ELISA. Os animais foram tratados com uma única dose de CTX (44 µg/kg) ou salina (50 µL), 1 hora antes da injeção intraperitoneal de Cg (15 mg/kg) ou salina (200 µL). Após 4 horas da injeção i.p., as amostras de exsudato peritoneal foram coletadas. Amostras de exsudato peritoneal de diferentes grupos de tratamentos (Salina+Salina; Salina+Cg; CTX+Salina; CTX+Cg) foram utilizadas para a determinação da concentração da citocina. Os resultados expressam a média ± e.p.m. de pelo menos 5 animais por grupo.*$p<0.05$ estatisticamente diferente do grupo Salina+Salina; # $p<0.05$ estatisticamente diferente dos grupos Salina+Salina e Salina+Cg.

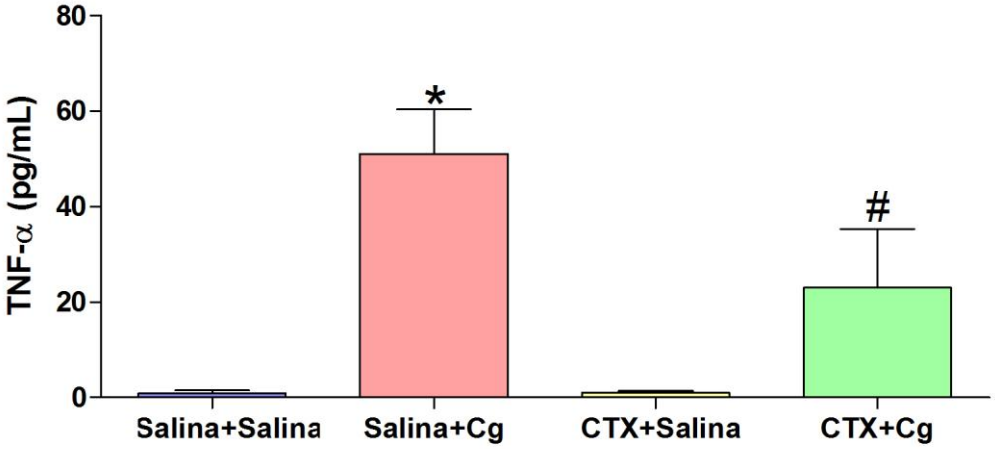


Figura 19. Efeito da CTX sobre a secreção de TNF-α em exsudato peritoneal de camundongos. A concentração de TNF-α foi determinada por ELISA. Os animais foram tratados com uma única dose de CTX (44 µg/kg) ou salina (50 µL), 7 dias antes da injeção intraperitoneal de Cg (15 mg/kg) ou salina (200 µL). Após 4 horas da injeção i.p., as amostras de exsudato peritoneal foram coletadas. Amostras de exsudato peritoneal de diferentes grupos de tratamentos (Salina+Salina; Salina+Cg; CTX+Salina; CTX+Cg) foram utilizadas para a determinação da concentração da citocina. Os resultados expressam a média ± e.p.m. de pelo menos 5 animais por grupo.*$p<0.05$ estatisticamente diferente do grupo Salina+Salina; # $p<0.05$ estatisticamente diferente dos grupos Salina+Salina e Salina+Cg.

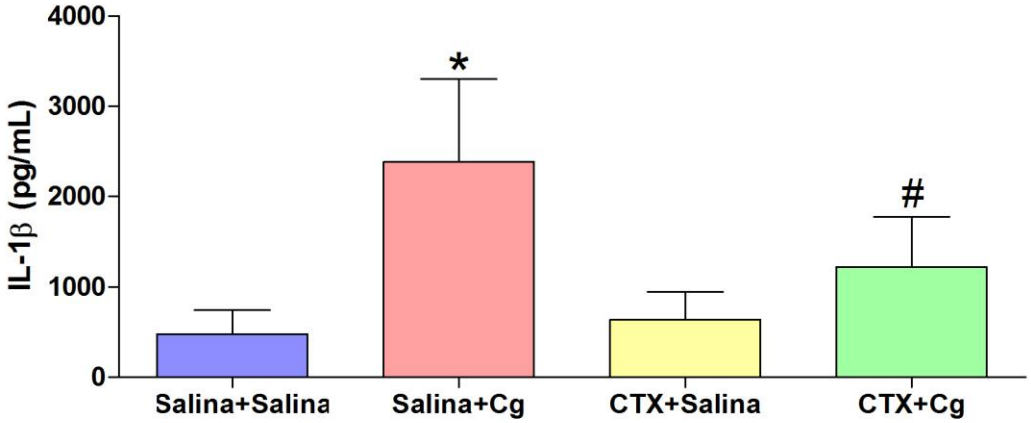


Figura 20. Efeito da CTX sobre a secreção de IL-1β em exsudato peritoneal de camundongos. A concentração da IL-1β foi determinada por ELISA. Os animais foram tratados com uma única dose de CTX (44 µg/kg) ou salina (50 µL), 7 dias antes da injeção intraperitoneal de Cg (15 mg/kg) ou salina (200 µL). Após 4 horas da injeção i.p., as amostras de exsudato peritoneal foram coletadas. Amostras de exsudato peritoneal de diferentes grupos de tratamentos (Salina+Salina; Salina+Cg; CTX+Salina; CTX+Cg) foram utilizadas para a determinação da concentração da citocina. Os resultados expressam a média ± e.p.m. de pelo menos 5 animais por grupo.*$p<0.05$ estatisticamente diferente do grupo Salina+Salina; # $p<0.05$ estatisticamente diferente dos grupos Salina+Salina e Salina+Cg.

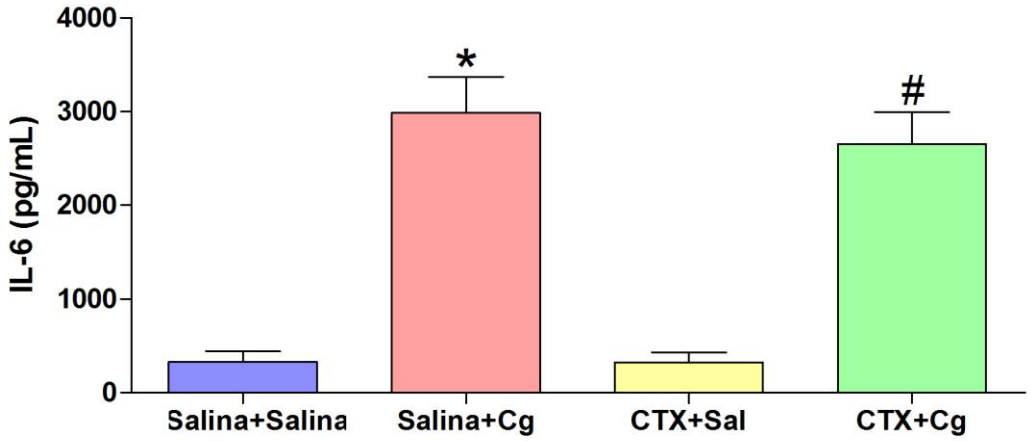


Figura 21. Efeito da CTX sobre a secreção de IL-6 em exsudato peritoneal de camundongos. A concentração da IL-6 foi determinada por ELISA. Os animais foram tratados com uma única dose de CTX (44 µg/kg) ou salina (50 µL), 7 dias antes da injeção intraperitoneal de Cg (15 mg/kg) ou salina (200 µL). Após 4 horas da injeção i.p., as amostras de exsudato peritoneal foram coletadas. Amostras de exsudato peritoneal de diferentes grupos de tratamentos (Salina+Salina; Salina+Cg; CTX+Salina; CTX+Cg) foram utilizadas para a determinação da concentração da citocina. Os resultados expressam a média ± e.p.m. de pelo menos 5 animais por grupo.*$p<0.05$ estatisticamente diferente do grupo Salina+Salina; # $p<0.05$ estatisticamente diferente dos grupos Salina+Salina e Salina+Cg.

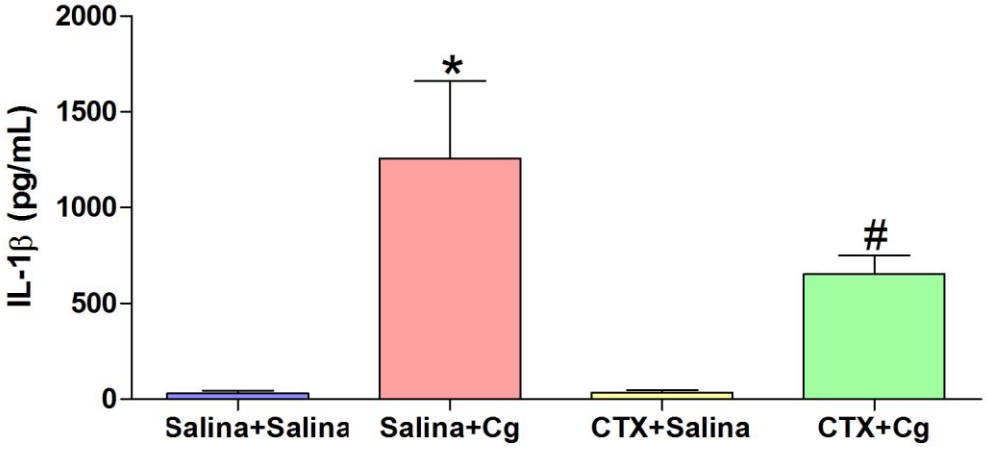


Figura 22. Efeito da CTX sobre a secreção de IL-1β em exsudato peritoneal de camundongos. A concentração da IL-1β foi determinada por ELISA. Os animais foram tratados com uma única dose de CTX (44 µg/kg) ou salina (50 µL), 14 dias antes da injeção intraperitoneal de Cg (15 mg/kg) ou salina (200 µL). Após 4 horas da injeção i.p., as amostras de exsudato peritoneal foram coletadas. Amostras de exsudato peritoneal de diferentes grupos de tratamentos (Salina+Salina; Salina+Cg; CTX+Salina; CTX+Cg) foram utilizadas para a determinação da concentração da citocina. Os resultados expressam a média ± e.p.m. de pelo menos 5 animais por grupo.*$p<0.05$ estatisticamente diferente do grupo Salina+Salina; # $p<0.05$ estatisticamente diferente dos grupos Salina+Salina e Salina+Cg.

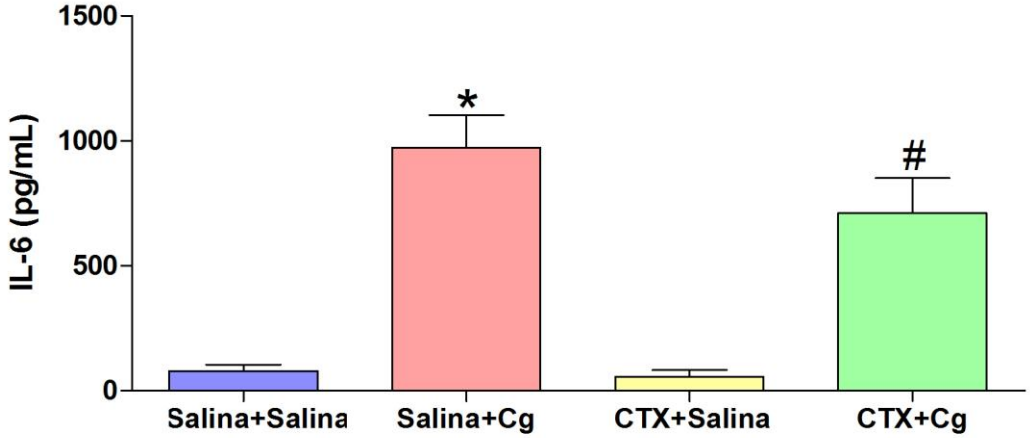


Figura 23. Efeito da CTX sobre a secreção de IL-6 em exsudato peritoneal de camundongos. A concentração da IL-6 foi determinada por ELISA. Os animais foram tratados com uma única dose de CTX (44 µg/kg) ou salina (50 µL), 14 dias antes da injeção intraperitoneal de Cg (15 mg/kg) ou salina (200 µL). Após 4 horas da injeção i.p., as amostras de exsudato peritoneal foram coletadas. Amostras de exsudato peritoneal de diferentes grupos de tratamentos (Salina+Salina; Salina+Cg; CTX+Salina; CTX+Cg) foram utilizadas para a determinação da concentração da citocina. Os resultados expressam a média ± e.p.m. de pelo menos 5 animais por grupo.*$p<0.05$ estatisticamente diferente do grupo Salina+Salina; # $p<0.05$ estatisticamente diferente dos grupos Salina+Salina e Salina+Cg.

4.6. Dosagem de Prostaglandina E_2 e Leucotrieno B_4

Os animais do grupo Salina+Cg, 4 horas após a administração de Cg pela via i.p., apresentam um aumento dos níveis de PGE_2 (Fig. 24) e de LTB_4 (Fig. 25), quando comparados aos animais do grupo Salina+Salina.

4.6.1. Efeito da CTX sobre a secreção de Prostaglandina E_2 e Leucotrieno B_4

Os animais pré-tratados com a CTX, 1 hora antes da injeção i.p. de Cg, não apresentaram diferença estatisticamente significante dos níveis de PGE_2 (Fig.24) e LTB_4 (Fig.25) secretados, quando comparados aos animais do grupo controle tratado com salina (Salina+Cg).

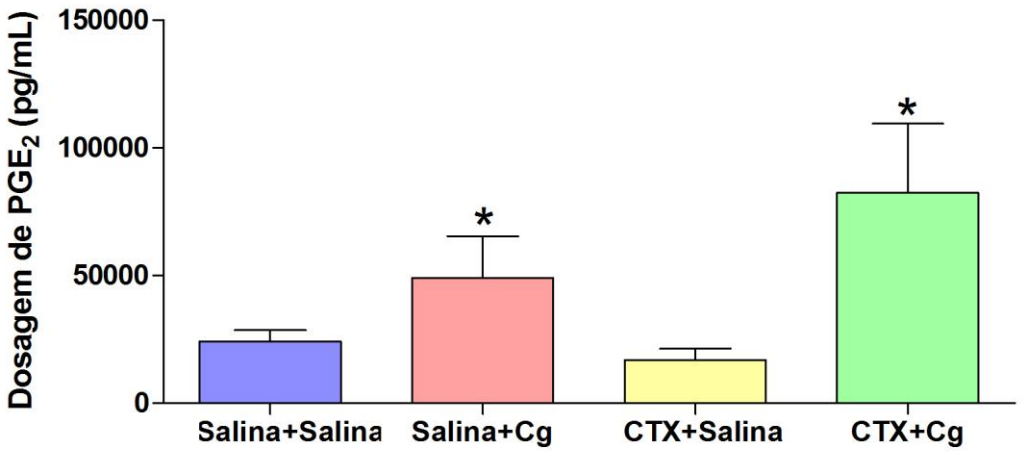


Figura 24. Efeito da CTX sobre a secreção de prostagladina E_2 em sobrenadante de exsudato peritoneal de camundongos. A concentração de PGE_2 foi determinada por ELISA. Os animais foram tratados com uma única dose de CTX (44 µg/kg) ou salina (50 µL), 1 hora antes da injeção intraperitoneal de Cg (15 mg/kg) ou salina (200µL). Após 4 horas da injeção i.p., as amostras de exsudato peritoneal foram coletadas e centrifugadas. Amostras de sobrenadantes de exsudato peritoneal de diferentes grupos de tratamentos (Salina+Salina; Salina+Cg; CTX+Salina; CTX+Cg) foram utilizadas para a determinação da secreção de PGE_2. Os resultados expressam a média ± e.p.m. de pelo menos 5 animais por grupo. *$p<0.05$ estatisticamente diferente do grupo Salina+Salina.

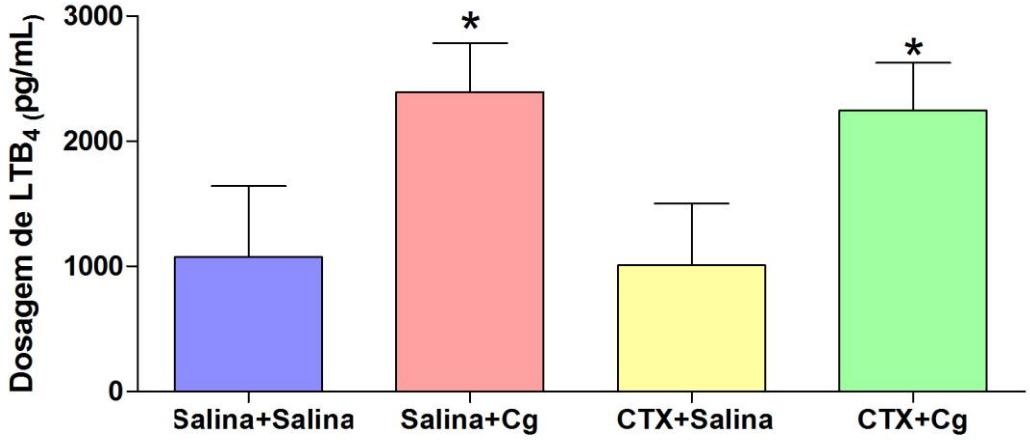


Figura 25. Efeito da CTX sobre a secreção de leucotrieno B_4 em sobrenadante de exsudato peritoneal de camundongos. A concentração de LTB_4 foi determinada por ELISA. Os animais foram tratados com uma única dose de CTX (44 µg/kg) ou salina (50 µL), 1 hora antes da injeção intraperitoneal de Cg (15 mg/kg) ou salina (200 µL). Após 4 horas da injeção i.p., as amostras de exsudato peritoneal foram coletadas e centrifugadas. Amostras de sobrenadantes de exsudato peritoneal de diferentes grupos de tratamentos (Salina+Salina; Salina+Cg; CTX+Salina; CTX+Cg) foram utilizadas para a determinação da secreção de LTB_4. Os resultados expressam a média ± e.p.m. de pelo menos 5 animais por grupo. *$p<0.05$ estatisticamente diferente do grupo Salina+Salina.

4.7 Expressão de iNOS e p65 em sobrenadante de macerado de patas de camundongos

As expressões de iNOS e p65 foram obtidas por meio dos ensaios de Western blotting (Figs. 26 e 27)

Os resultados mostraram que a injeção intraplantar de Cg induziu um aumento da expressão de iNOS e p65. Esse aumento pôde ser observado mediante a revelação de bandas imunoreativas com massas moleculares relativas de aproximadamente 130 kDa e 65 kDa respectivamente, em amostras de sobrenadante de macerado de pata. Já os animais que receberam apenas a injeção intraplantar de salina, apresentaram uma banda de menor intensidade.

4.7.1 Efeito da CTX sobre a expressão de iNOS e p65 em sobrenadante de macerado de patas de camundongos

Os resultados mostraram que não houve diferença entre a imunoreatividade das bandas com massa molecular correspondente a iNOS (130 kDa) de amostras de animais tratados com a CTX (CTX+Cg) 1 hora antes da injeção intraplantar de Cg, quando comparada a imunoreatividade da mesma banda proveniente de amostras de animais tratados com salina (Salina+Cg) (Fig.26).

Por outro lado, o pré-tratamento dos animais com a CTX foi capaz de inibir a expressão de p65, já que foi possível observar uma diminuição significante da imunoreatividade da banda com massa molecular relativa de aproximadamente 65 kDa, correspondente a p65, quando comparada a imunorreatividade da banda correspondente, de animais do grupo controle, tratados com salina (Salina+Cg) (Fig.27).

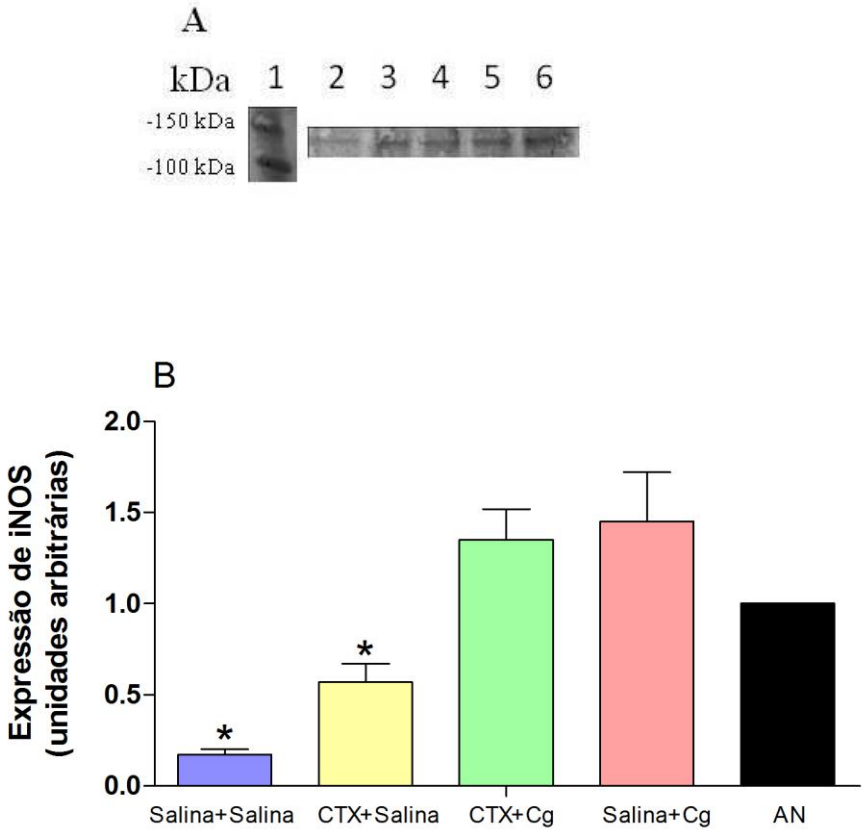


Figura 26. Efeito da CTX sobre a expressão de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) em sobrenadante de macerado de patas de camundongos. A expressão de concentração de iNOS foi determinada por Western blotting. Os animais foram tratados com uma única dose de CTX (44 µg/kg) ou salina (50 µL), 1 hora antes da injeção intraplantar de Cg (15 mg/kg) ou salina (200 µL). Após 4 horas da injeção i.pl., as patas dos animais foram coletadas. As concentrações das amostras de sobrenadante do macerado de patas foram ajustadas para 50 µg de proteína e aplicadas em gel de poliacrilamida 10%. As bandas de proteínas foram posteriormente transferidas para membranas de nitrocelulose. Na sequência as membranas foram incubadas com os respectivos anticorpos primário (anti-iNOS) e secundário conjugado com peroxidase (anti-IgG de coelho) e a revelação de uma banda correspondente à iNOS de aproximadamente 130 kDa foi realizada utilizando 3,3 Diaminobenzidine (DAB).Os resultados expressam a média ± e.p.m. de pelo menos 5 animais por grupo. A: Intensidade das bandas imunoreativas: Raia 1: Padrão de peso molecular; Raia 2: Salina+Salina; Raia 3: CTX+Salina; Raia 4: CTX+Cg; Raia 5: Salina+Cg; Raia 6: Amostra normalizadora. B: Análise densitométrica das bandas imunoreativas. *$p<0.05$ estatisticamente diferente do grupo Salina+Salina.

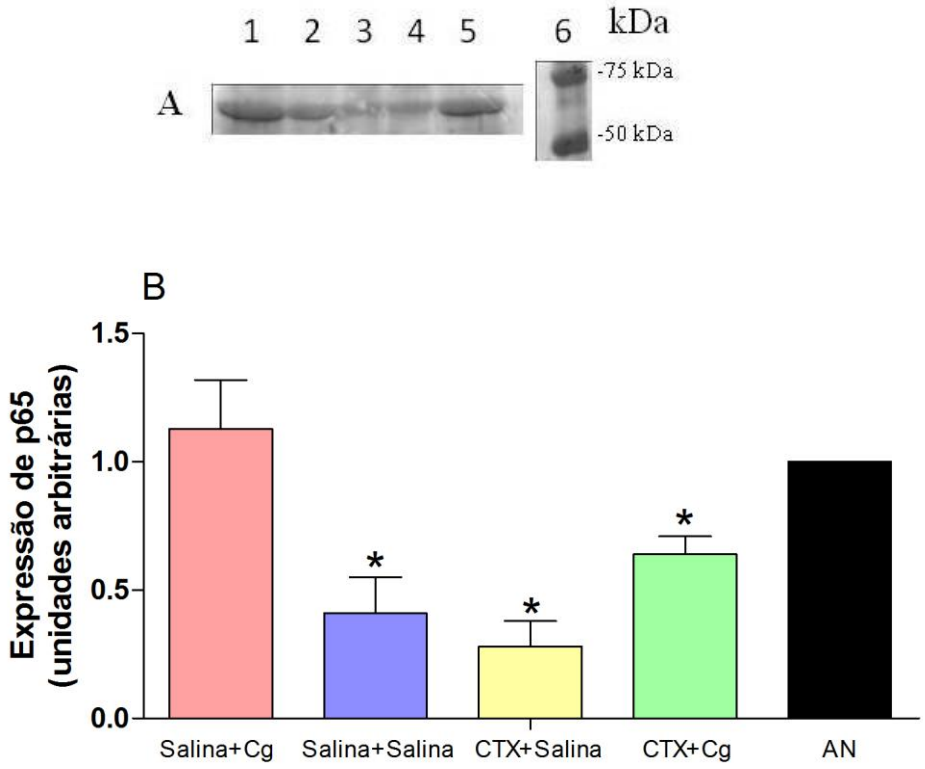


Figura 27. Efeito da CTX sobre a expressão de p65 em sobrenadante de macerado de patas de camundongos. A expressão de concentração de p65 foi determinada por Western blotting. Os animais foram tratados com uma única dose de CTX (44 µg/kg) ou salina (50 µL), 1 hora antes da injeção intraplantar de Cg (15 mg/kg) ou salina (200µL). Após 4 horas da injeção i.pl., as patas dos animais foram coletadas. As concentrações das amostras de sobrenadante do macerado de patas foram ajustadas para 50 µg de proteína e aplicadas em gel de poliacrilamida 10%, As bandas de proteínas foram posteriormente transferidas para membranas de nitrocelulose. Na sequência as membranas foram incubadas com os respectivos anticorpos primário (anti-p65) e secundário conjugado com peroxidase (anti-IgG de coelho) e a revelação de uma banda correspondente à p65 de 60-65 kDa foi realizada utilizando 3,3 Diaminobenzidine (DAB). .Os resultados expressam a média ± e.p.m. de pelo menos 5 animais por grupo. A: Intensidade das bandas imunoreativas: Raia 1: Salina+Cg; Raia 2: Salina+Salina; Raia 3: CTX+Salina; Raia 4: CTX+Cg; Raia 5: Amostra normalizadora (AN); Raia 6: Padrão de peso molecular. B: Análise densitométrica das bandas imunoreativas. *$p<0.05$ estatisticamente diferente do grupo Salina+Cg.

4.8. Avaliação do efeito dos glicocorticóides no efeito anti-inflamatório da CTX sobre a migração celular induzida pela Cg

4.8.1. Avaliação dos tratamentos com Mifepristone e Metirapona no efeito anti-inflamatório da CTX sobre a migração celular induzida pela Cg

Os animais que receberam a injeção s.c. do antagonista de receptor para glicocórticoides (Mifepristone), 30 minutos antes do tratamento com a CTX (Mifepristone+CTX+Cg), continuaram apresentando uma redução significante do número de células que migraram para a cavidade peritoneal, principalmente polimorfonucleares, quando comparados aos animais que não foram tratados com o Mifepristone (Salina+CTX+Cg) (Fig 28).

O mesmo resultado foi observado nos animais que receberam a injeção subcutânea do inibidor de síntese de glicocorticóides (Metirapona), 30 minutos antes do tratamento com a CTX (Metirapona+CTX+Cg). Esses animais apresentaram uma redução significante do número de células que migraram para a cavidade peritoneal, principalmente polimorfonucleares, da mesma forma que os animais que não receberam o tratamento com o Mifepristone (Salina+CTX+Cg) (Fig. 29).

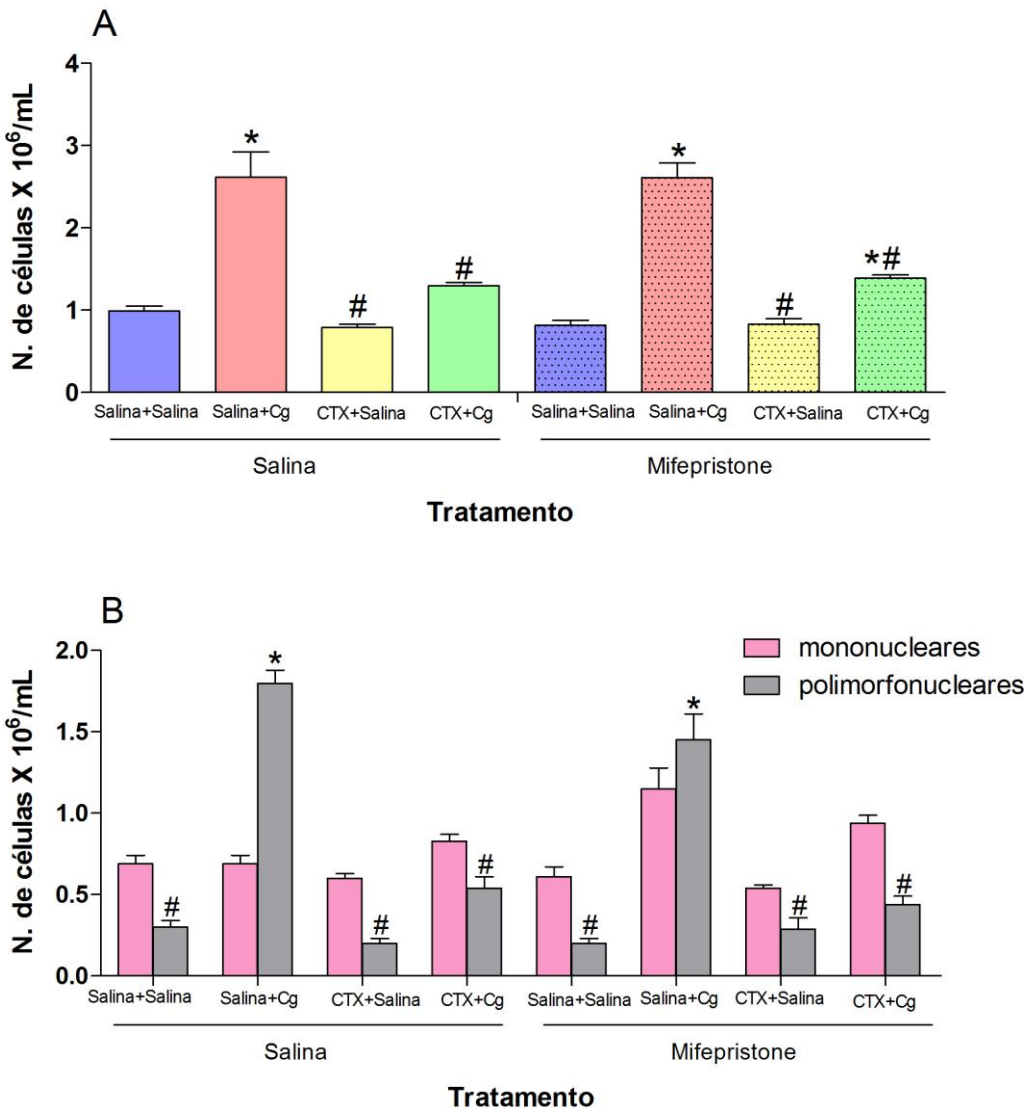


Figura 28. Efeito de glicocórticoides endógenos sobre a ação anti-inflamatória da CTX sobre a migração celular induzida por Cg. Os animais foram tratados com Mifepristone (antagonista de receptor de glicocorticóides) (50 mg/kg) s.c. ou salina (100µL). Após 30 minutos, os animais foram tratados com uma única dose de CTX (44 µg/kg) ou salina (50 µL), 1 hora antes da injeção intraperitoneal de Cg (15 mg/kg) ou salina (200 µL). Após 4 horas da injeção i.p., as amostras de exsudato peritoneal de diferentes grupos de tratamentos coletadas e centrifugadas. A contagem total dos leucócitos (A) foi realizada em câmara de Neubauer e a diferencial (B), em esfregaços corados pancromicamente. Os resultados expressam a média ± e.p.m. de pelo menos 5 animais por grupo. *$p<0.05$ estatisticamente diferente do grupo Salina+Salina; # $p<0.05$ estatisticamente diferente do grupo Salina+Cg.

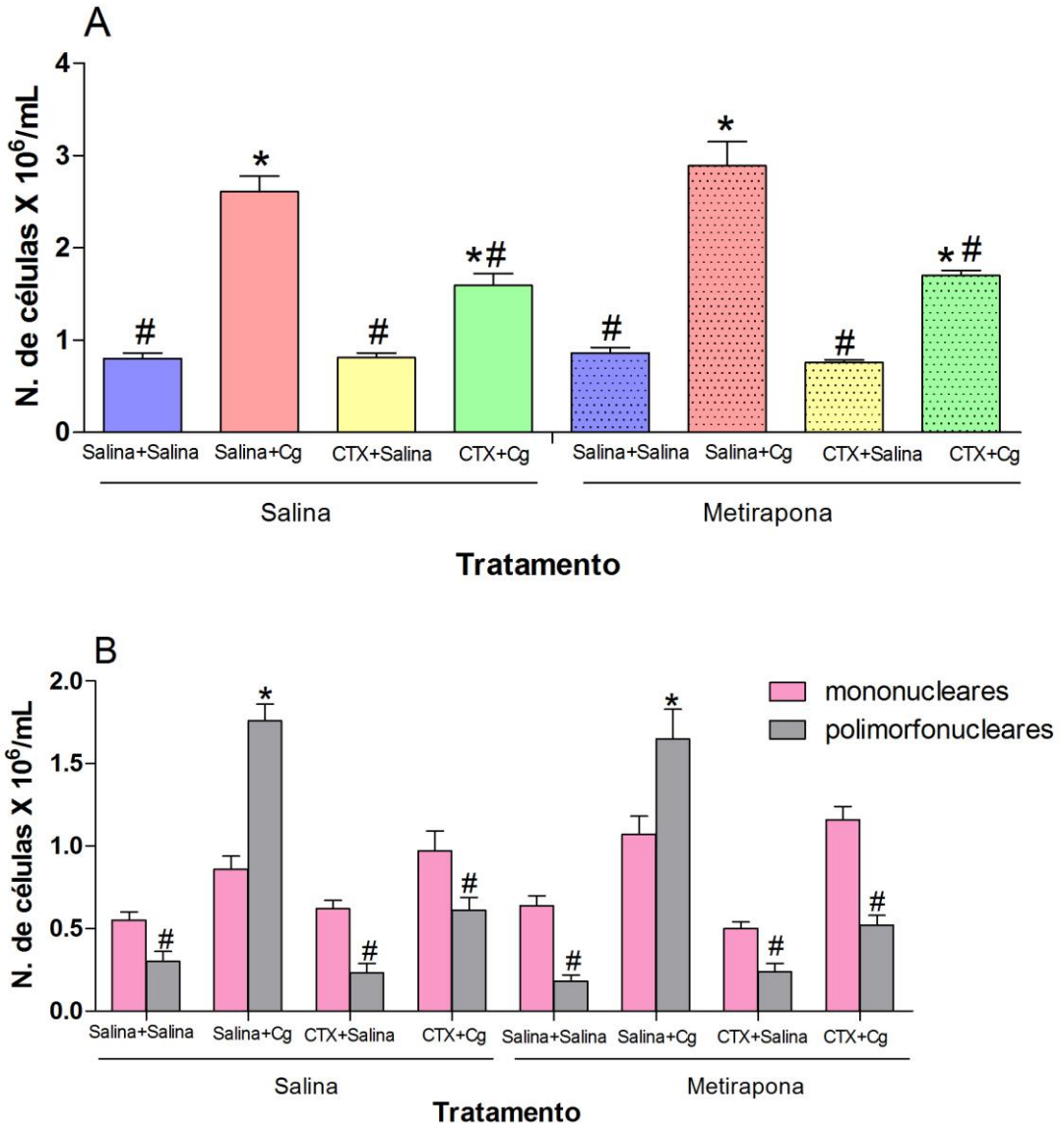


Figura 29. Efeito de glicocorticóides endógenos sobre a ação anti-inflamatória da CTX sobre a migração celular induzida por Cg. Os animais foram tratados com Metirapona (inibidor da síntese de glicocorticóides) (50 mg/kg) s.c. ou salina (100µL). Após 30 minutos, os animais foram tratados com uma única dose de CTX (44 µg/kg) ou salina (50 µL), 1 hora antes da injeção intraperitoneal de Cg (15 mg/kg) ou salina (200 µl). Após 4 horas da injeção i.p., as amostras de exsudato peritoneal de diferentes grupos de tratamentos foram coletadas e centrifugadas. A contagem total dos leucócitos (A) foi realizada em câmara de Neubauer e a diferencial (B), em esfregaços corados pancromicamente. Os resultados expressam a média ± e.p.m. de pelo menos 5 animais por grupo. *$p<0.05$ estatisticamente diferente do grupo Salina+Salina; # $p<0.05$ estatisticamente diferente do grupo Salina+Cg.

5. Discussão

Como citado na Introdução, várias evidências têm demonstrado que o veneno de *Crotalus durissus terrificus* (VCdt) ou suas toxinas isoladas são capazes de modular a resposta inflamatória. Recentemente, foi demonstrado que a CTX apresenta uma ação inibitória prolongada sobre o edema e a migração celular, induzidos pela Cg. (Nunes *et al.*, 2010). A resposta inflamatória induzida pela Cg envolve a participação de mediadores pró-inflamatórios, tais como: NO, prostaglandina E_2, e citocinas pró-inflamatórias (TNF-α, IL-1α e IL-1β, IL-6). Além disso, tem sido observado o aumento da expressão das moléculas de adesão P-selectina e ICAM-1 no endotélio vascular após a administração desse agente inflamatório (Utsunomiya *et al.*, 1991; Cuzzocrea *et al.*, 1999; Cuzzocrea *et al.*, 2006; Fröde *et al.*, 2001; Mazzon *et al.*, 2008; Dalmarco *et al.*, 2008; Iwata *et al.*, 2010).

Dessa forma, dando continuidade aos estudos que investigam a ação modulatória doa CTX sobre a inflamação, o presente estudo investigou o efeito da CTX, sobre a expressão de moléculas de adesão e mediadores inflamatórios envolvidos na migração celular induzida pela Cg.

Inicialmente, a ação da CTX sobre a migração de células para o sitio inflamatório, for avaliada por análises histológicas do tecido subcutâneo do coxim plantar. Os dados mostraram que o pré-tratamento (7dias e 1h) reduziu as áreas edematogênicas e o infiltrado celular induzido pela Cg. Esses resultados confirmam os dados de Nunes e colaboradores (2010) e ainda, caracterizam morfologicamente, pela primeira vez, a ação inibitória da CTX sobre a migração celular para o tecido subcutâneo.

O processo de recrutamento leucocitário em direção ao foco inflamatório envolve uma série de eventos vasculares, dentre estes, a interação dos leucócitos com o endotélio vascular. (Ley *et al.*, 2007; Muller 2009). Nesse sentido, Nunes e colaboradores (2010), demonstraram que a CTX inibe a interação leucócito-endotélio induzida pela Cg, particularmente, a adesão de leucócitos ao endotélio vascular. O *rolling* leucocitário, mediado pela superfamília das selectinas, é considerado um pré-requisito para que ocorra a firme adesão dos neutrófilos sobre a superfície endotelial, mediada pelas integrinas β_2 (LFA-1 e Mac-1). Essas integrinas ligam-se a imunoglobulina ICAM-1, expressa na superfície do endotélio vascular (Rankin, 2004; Ley *et al.*, 2007; Muller, 2009; Eniola-Adefeso *et al.*, 2009). Sendo assim, com a

finalidade de investigar se o efeito inibitório da CTX sobre a migração celular estaria associado à redução das moléculas de adesão, foi avaliado o efeito da CTX sobre a expressão de P-selectina, ICAM-1 e PECAM-1 induzida pela Cg no tecido subcutâneo do coxim plantar. O tempo de expressão dessas moléculas difere de acordo com o órgão ou tecido avaliado e, ainda com o agente inflamatório administrado (Eppihimer *et al.*, 1996), porém a literatura existente não refere o tempo de expressão de P-selectina e ICAM-1 induzida pela Cg no tecido subcutâneo. Entretanto, 4 horas após a injeção de Cg, têm sido observado um aumento de P-selectina e ICAM-1 no tecido pulmonar, (Cuzzocrea *et al.*, 1999; 2000 e 2006).

Baseado nestes dados de literatura, no presente estudo, inicialmente foi avaliada a expressão de P-selectina e ICAM-1 no tecido subcutâneo, 4 horas após a injeção intraplantar de Cg. Entretanto, diferente do que foi demonstrado para o tecido pulmonar, neste tempo (4 horas) foi observada uma baixa expressão de P-selectina e ICAM-1 no tecido subcutâneo (Dados não mostrados).

Assim, levando em conta a observação por microscopia intravital, de que o pico da adesão de leucócitos induzida pela Cg é de 2 horas (Nunes *et al.*, 2010) o efeito da CTX sobre a expressão de P-selectina e ICAM-1 foi avaliado antes do pico de adesão ou seja, 30 minutos ou 1 hora após a injeção de Cg. Nesses tempos, o pré-tratamento com a CTX (7 dias ou 1 hora) reduziu a expressão dessas moléculas induzida pela Cg.

Além dessas moléculas de adesão, a PECAM-1, presente entre as junções das células endoteliais, também está intimamente envolvida no processo de transmigração de leucócitos induzida pela Cg (Chosay *et al.*, 1998; Woodfin *et al.*, 2007; Privratsky *et al.*, 2010). Sendo assim, neste estudo foi avaliado também o efeito da CTX sobre a expressão de PECAM-1 em endotélio vascular no tecido subcutâneo do coxim plantar dos animais. Entretanto, diferente do que foi observado para P-selectina e ICAM-1, nesses tempos, o pré-tratamento com a CTX não foi capaz de alterar a expressão da PECAM-1. 30 minutos ou 1 ou 2 horas após a injeção de Cg.

Esses resultados sugerem que o efeito inibitório da CTX sobre a interação leucócito-endotélio e, consequentemente, sobre a migração celular pode estar associado ao decréscimo da expressão de P-selectina e de ICAM-1. Ainda, os resultados mostram que a CTX tem um efeito inibitório prolongado sobre essas moléculas.

Takeshita e colaboradores (2004) demonstraram que a migração de neutrófilos observada 4 horas após a injeção de Cg envolve também a expressão de integrinas, principalmente de Mac-1 (CD11b/CD18). Nesse sentido, foi avaliado também o efeito

da CTX sobre a expressão dessa molécula de adesão nos leucócitos presentes no exsudato peritoneal induzido pela Cg. Ao contrário do observado no endotélio, a CTX não alterou a expressão de Mac-1 na superfície dos leucócitos. Apesar desse resultado, não deve ser descartada a idéia de que a CTX pode induzir o decréscimo na expressão dessas moléculas, na superfície dos leucócitos do sangue periférico que não migraram. Esse fato poderia também contribuir para a redução da migração dessas células para a cavidade peritoneal. No entanto, futuros estudos deverão se desenvolvidos para avaliar o efeito da CTX sobre a expressão de moléculas de adesão nos leucócitos presentes no sangue periférico e na medula óssea.

Como citado anteriormente, a Cg aumenta os níveis de PGE_2 e LTB_4. De fato a injeção intraperitoneal de Cg induziu aumento desses mediadores, porém o pré-tratamento (1h) dos animais com a CTX não alterou os níveis de secreção de PGE_2 e LTB_4 induzida pela Cg na cavidade peritoneal. Esse dado indica que o efeito inibitório da CTX sobre a migração celular induzida pela Cg não está associado com a redução desses mediadores. Da mesma forma, foi demonstrado por Sampaio e colaboradores (2006) que a PGE_2 não está envolvida no efeito inibitório sistêmico da CTX sobre a fagocitose por macrófagos, apesar desta toxina, estimular a produção desse mediador por macrófagos *in vitro* (Sampaio *et al.*, 2006).

Alguns estudos mostram que o óxido nítrico é um mediador que regula negativamente a migração induzida pela Cg (Ialenti *et al.*, 2000; Dal Secco *et al.*, 2003; Iwata *et al.*, 2010). Dal Secco e colaboradores (2006) demonstraram que a administração de inibidores de NOSs aumenta a migração de neutrófilos induzida pela Cg na cavidade peritoneal e, ainda que esse aumento está associado à ICAM-1, uma vez que nos animais deficientes em ICAM-1 esse efeito não foi observado. Além disso, algumas evidências *in vitro* sugerem que o NO regula negativamente a expressão de ICAM-1 e outras moléculas de adesão, como a P e E-selectina (Gauthier *et al.*,1994; Biffl *et al.*, 1996).

Assim, com a finalidade de verificar se o decréscimo da expressão das moléculas de adesão induzido pela CTX, estaria associada à ação do óxido nítrico, foi avaliado o efeito desta toxina sobre a expressão de iNOS, uma vez que esta enzima contribui para extensão da resposta inflamatória induzida pela Cg (Cuzzocrea *et al.*, 2000). Os dados mostraram que a CTX não altera a expressão de iNOS induzida pela Cg no tecido subcutâneo. Apesar desse resultado, uma possível modulação negativa do oxido nítrico sobre a expressão de P-selectina e ICAM-1 não deve ser descartada, uma vez que já foi

demonstrado que o VCdt e a CTX aumentam os níveis de NO produzidos por macrófagos (Sampaio *et al.*, 2001).

Em relação ao efeito da CTX sobre a secreção de citocinas induzida pela Cg, na cavidade peritoneal, foi observado que esta toxina induz decréscimo nos níveis de IL-1 β, IL-6 e de TNF-α presentes no exsudato peritoneal. Assim como observado para as moléculas de adesão esse efeito inibitório foi prolongado, uma vez que uma única dose de CTX inibe esses parâmetros por até 7 dias.

Dessa forma, podemos sugerir que essa inibição pode contribuir para o efeito anti-inflamatório prolongado da CTX sobre a migração celular induzida pela Cg, uma vez que estas citocinas estimulam a produção de quimiocinas , induzem a ativação das células endoteliais e por sua vez aumento da expressão das moléculas de adesão presentes nestas células (Dinarello, 1996; Sppörri *et al.*, 200; Ley *et al*., 2007; Lawson & Wolf, 2009).

É importante destacar que a transcrição gênica de mediadores pró-inflamatórios, como por exemplo, as citocinas (TNF-α, IL-1β e IL-6) é regulada pela ativação do fator de transcrição NF-κB (Arend & Dayer, 1995; Kopp & Ghosh, 1995; Barens & Karin, 1997; Kubes & McCafferty, 2000; Won *et al.*, 2006). Sendo assim, para investigar o envolvimento NF-κB na ação anti-inflamatória da CTX avaliamos o efeito desta toxina sobre a ativação do fator de transcrição NF-κB.

Os resultados mostraram que a CTX reduz a expressão da subunidade p65, o que indica um efeito inibitório sobre a translocação dessa subunidade para o núcleo. Baseado neste resultado, podemos sugerir que a inibição da ativação do NFκB pode contribuir para a redução dos níveis de secreção de citocinas e, portanto, para a ação anti-inflamatória da CTX.

A resposta inflamatória pode ser regulada por anti-inflamatórios endógenos, entre eles os glicocorticoides, os quais se ligam a receptores específicos inibindo a transcrição de genes pró-inflamatórios (Beck *et al*., 2008). Dessa forma, a contribuição desses mediadores para a ação anti-inflamatória da CTX também deve ser considerada, uma vez que a CTX aumenta os níveis de glicocorticoides (Chisari, *et al.*, 1998; Cardoso *et al.*, 2001). Nesse sentido, foi avaliada a influência dos glicocorticoides sobre o efeito inibitório da CTX sobre a migração celular induzida pela Cg. Os resultados sugerem que o efeito anti-inflamatório da CTX não está associado à ação de glicocorticoides, uma vez que, o bloqueio da síntese ou da interação dos

glicocorticoides com seus respectivos receptores não alterou o efeito inibitório da CTX sobre a migração celular induzida pela Cg.

As lipoxinas são mediadores lipídicos produzidos localmente pela via da lipoxigenase durante o processo inflamatório, apresentam potente ação anti-inflamatória, inibindo a infiltração de neutrófilos em modelos de peritonite (Bannenberg *et al.*, 2005), a liberação de citocinas, bem como a expressão de moléculas de adesão na superfície celular (Moncada, 1992; Fiore & Serhan 1995; Diamond *et al.*, 1999). Adicionalmente, foi também demonstrada em estudo recente sua ação inibitória sobre a ativação de NFκB (Wu *et al.*, 2011). Esses mediadores exercem suas funções biológicas pela ligação a receptores específicos FPRP2/ALX, pertencentes à família dos receptores peptídeo formil (Chiang & Serhan, 2006; Ye *et al.*, 2009).

Dessa forma, considerando que o efeito anti-inflamatório prolongado da CTX envolve a participação de receptores peptídeo formil e, ainda, que a CTX aumenta a liberação de LXA_4 por macrófagos (Sampaio *et al.*, 2006), podemos sugerir que a lipoxina pode contribuir para os efeitos inibitórios da CTX demonstrados no presente estudo. Entretanto, estudos deverão ser realizados para comprovar essa hipótese.

Em conjunto, os resultados deste estudo caracterizam a ação anti-inflamatória da CTX sobre a migração celular induzida pela Cg, evidenciando que esta toxina tem ação inibitória prolongada sobre a expressão de moléculas de adesão e sobre a secreção de citocinas pró-inflamatórias. Esse estudo evidencia ainda, que a CTX inibe a ativação de NFκB. Essa inibição, por sua vez, pode levar a alteração na transcrição dos genes pró-inflamatórios, o que pode contribuir para a ação anti-inflamatória desta toxina.

Assim baseado na importância do NFκB para a resposta inflamatória, podemos sugerir que essa toxina pode ser considerada um anti-inflamatório em potencial, uma vez que a descoberta de substâncias anti-inflamatórias capazes de inibir a ativação deste fator de transcrição (NF-κB) torna-se uma importante estratégia terapêutica na supressão do processo inflamatório (Luo *et al.*, 2010; Min *et al.*, 2010).

6. Resumo dos resultados

- As análises histológicas do tecido subcutâneo do coxim plantar de camundongos mostraram que a injeção intraplantar de Cg induz uma intensa reação inflamatória caracterizada por edema, e por intenso infiltrado inflamatório, caracterizado pelo aumento de leucócitos, principalmente polimorfonucleares.
- Os animais tratados com a CTX 7 dias ou 1 hora antes da injeção intraplantar de Cg apresentaram uma redução das áreas edematogênicas e do infiltrado inflamatório no tecido subcutâneo do coxim plantar.
- A injeção intraplantar de Cg induz um aumento da expressão de P-selectina, ICAM-1 e PECAM-1 em endotélio vascular.
- Os animais tratados com a CTX 7 dias ou 1 hora antes da injeção intraplantar de Cg apresentaram uma redução da expressão de P-selectina e ICAM-1 em endotélio vascular .
- O tratamento com a CTX não alterou a expressão de PECAM-1 em endotélio vascular e a expressão de Mac-1 presente no exsudato peritoneal.
- Após 4 horas da injeção intraperitoneal, a Cg induz um aumento da secreção de IL-1 β, IL-6 e TNF-α.
- Os animais tratados com a CTX 7 dias ou 1 hora antes da injeção intraperitoneal de Cg apresentaram uma diminuição significante da secreção de TNF-α em exsudato peritoneal.
- Os animais tratados com a CTX 14 dias ou 7 dias ou 1 hora antes da injeção intraperitoneal de Cg apresentaram uma diminuição significante da secreção de IL-1 β, IL-6 no exsudato peritoneal.
- Após 4 horas da injeção intraperitoneal, a Cg induz um aumento da secreção de PGE_2 e de LTB_4 em exsudato peritoneal.

- O tratamento com a CTX não alterou a secreção de PGE_2 e de LTB_4 em exsudato peritoneal.
- Após 4 horas, a injeção intraplantar de Cg induziu o aumento da expressão de iNOS e de p65 no tecido subcutâneo do coxim plantar.
- Os animais tratados com a CTX apresentaram uma diminuição da expressão de p65, porém não alterou a expressão de iNOS no tecido subcutâneo do coxim plantar.
- Os glicocorticoides não interferem no efeito inibitório da CTX sobre a migração celular induzida pela Cg.

7. Conclusão

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que a ação anti-inflamatória prolongada da CTX, particularmente sobre a migração celular induzida pela Cg está associada ao decréscimo de citocinas pró-inflamatórias (TNF-α, IL-1β e IL-6) e das moléculas de adesão, P-selectina e ICAM-1, presentes no endotélio vascular.

Essa ação anti-inflamatória da CTX pode estar correlacionada ao efeito inibitório desta toxina sobre a ativação do NF-κB.

8. Resumo

A literatura relata que o veneno de *Crotalus durissus terrificus* (VCdt) ou suas toxinas isoladas modulam a resposta inflamatória. A crotoxina (CTX) é a principal toxina do VCdt, representando aproximadamente 65% do conteúdo do veneno bruto. Dando continuidade aos estudos que evidenciam o efeito modulador do VCdt sobre a inflamação, foi demonstrado que o VCdt apresenta um efeito anti-inflamatório prolongado sobre a resposta inflamatória induzida pela carragenina (Cg), em camundongos. Esse estudo mostrou que uma única dose de VCdt, administrada pela via subcutânea, 7 ou 21 dias antes da injeção de Cg inibe, respectivamente, o desenvolvimento do edema de pata e a migração celular para a cavidade peritoneal, induzidos por este agente inflamatório. Este efeito anti-inflamatório também foi observado após a instalação da resposta inflamatória (Nunes *et al.*, 2007). Além disso, foi demonstrado também que a CTX, é a toxina responsável por este efeito anti-inflamatório prolongado. Ainda, dados recentes mostram que os receptores para peptídeo formil, tais como lipoxina/anexina, mediadores com potente ação anti-inflamatória, estão envolvidos no efeito da CTX. Em continuidade a essa linha de investigação, este trabalho teve por objetivo caracterizar o efeito da CTX sobre a expressão de mediadores pró-inflamatórios e de moléculas de adesão envolvidas na resposta inflamatória induzida pela Cg em camundongos. Além de avaliar também o efeito desta toxina sobre a translocação da subunidade p65 do NF-κB para o núcleo celular. Para tanto, foi, investigado o efeito de uma única dose de CTX (44 µg/kg) sobre: a expressão de P-selectina, ICAM-1, PECAM-1 e Mac-1; sobre a secreção de TNF-α, IL-1β, IL-6, PGE_2, e LTB_4 e sobre a expressão de iNOS e p65. Cabe destacar ainda que, um inibidor da síntese de glicocorticoides (Metirapona), bem como um antagonista de receptor para glicocorticoides (Mifepristone) foram administrados antes do tratamento da CTX, para avaliar também a participação de glicocorticoides endógenos no efeito anti-inflamatório da CTX. A administração subcutânea de uma única dose de CTX produziu: 1- diminuição da secreção de TNF-α, IL-1β, IL-6; 2- diminuição da expressão de P-selectina e ICAM-1 e 3- diminuição da expressão de p65. Por outro lado, a CTX não alterou os níveis de PGE_2, e LTB_4, como também não alterou a expressão de iNOS e Mac-1. Além disso, nossos resultados sugerem que os glicocorticóides endógenos não interferem no efeito anti-inflamatório da CTX, uma vez que o pré-tratamento com Mifepristone ou Metirapona não alteraram o efeito inibitório desta toxina sobre a migração celular. Em conjunto, os resultados caracterizam o efeito anti-inflamatório da CTX sobre a migração celular induzida pela Cg e sugerem que esta toxina pode inibir a expressão de importantes substâncias pró-inflamatórias envolvidas na resposta inflamatória pela Cg ao inibir a ativação do fator de transcrição, NF-κB, uma vez que este fator favorece a transcrição de vários genes, cujas proteínas são importantes no desenvolvimento da resposta inflamatória. Esses resultados contribuem para a elucidação dos mecanismos envolvidos na ação modulatória da CTX sobre a resposta inflamatória.

Palavras-chave: crotoxina, inflamação, migração celular, carragenina, mediadores, moléculas de adesão.

9. Abstract

The literature shows that *Crotalus durissus terificus* snake venom (CdtV) or their toxins isolated modulate the inflammatory response. The crotoxin (CTX) is the main toxin of CdtV, representing approximately 65% of the content of the crude venom. It was demonstrated that CdtV presents a long-lasting anti-inflammatory effect induced by carrageenan (Cg) in mice. This study showed that a single dose of CdtV inhibits respectively, the development of paw edema and cell migration to the peritoneal cavity induced by this inflammatory agent. This anti-inflammatory effect was also observed after installation of the inflammatory response (Nunes *et al.*, 2007). Furthermore, it was also demonstrated that CTX is responsible for this long-lasting anti-inflammatory effect. Still, recent data show that the formil peptide receptors, such as lipoxin/anexin, mediators with potent anti-inflammatory action, are involved in the effect of CTX. The aim of this study is characterize the effect of CTX on the expression of proinflammatory mediators and adhesion molecules involved in the inflammatory response induced by Cg in mice and also evaluate the effect of the toxin on translocation of the p65 subunit of NF-κB to the nucleus. Therefore, it was investigated the effect of a single dose of CTX (44 µg/kg) on: P-selectin, ICAM-1, PECAM-1 and Mac-1 expression; TNF-α, IL-1β, IL-6, PGE_2 and LTB_4 secretion and, on iNOS and p65 expression. It should be noted that a synthesis of glucocorticoids inhibitor (Mifepristone) and a glucocorticoid antagonist receptor (Metyrapone) were administrated before CTX treatment to evaluate the involvement of endogenous glucocorticoids in the anti-inflammatory effect of CTX. Our results show that a single dose of CTX produced: reduction of TNF-α, IL-1β and IL-6 secretion; reduction of P-selectin and ICAM-1 expression and reduction of p65 expression. Moreover, CTX did not alter levels of PGE_2 and LTB_4 secretion and did not alter iNOS and Mac-1 expression. Furthermore, our results suggest that endogenous glucocorticoids do not interfere with anti-inflammatory effect of CTX, since that pre-treatment with Mifepristone and Metyrapone did not alter the inhibitory effect of this toxin on cell migration induced by Cg and suggest that this toxin can inhibit the expression of important proinflammatory substances involved in the inflammatory response induced by Cg to inhibit the NF-κB activation, since this factor promotes the transcription of several genes whose proteins are important in the development inflammatory response. These results contribute to the elucidation of the mechanisms involved in the modulatory action of CTX on the inflammatory response.

Keywords: crotoxin, inflammation, cell migration, carrageenan, adhesion molecules.

10. Referências Bibliográficas

ALDERTON, W.K.; COOPER, C.E.; KNOWLES, R.G.Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*, v.357, p.593-615, 2001.

AMORIM, M.F.; FRANCO DE MELLO, R.; SALIBA, F. Envenenamento botrópico e crotálico. *Memórias Instituto Butantan*, v.23, p.63-108, 1951.

AREND, W.P.; DAYER, J.M. Inhibition of the production and effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, v.38, p.151-160, 1995.

ARONOFF, D.M.; PERES, C.M.; SEREZANI, C.H.; BALLINGER, M.N.; CARSTENS J.K.; COLEMAN, N.; MOORE, B.B.; PEEBLES, R.S.; FACCIOLI, L.H.; PETERS-GOLDEN, M. Synthetic prostacyclin analogs differentially regulate macrophage function via distinct analog-receptor binding specificities. *The Journal of Immunology*, v.178, n.3, p.1628-1634, 2007.

AZEVEDO-MARQUES, M.M.; CUPO, P.; COIMBRA,T.M.; HERING. S.E.; ROSSI,M.A.; LAVRE,C.J. Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induce by South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in Brazil. *Toxicon***,** v.23, n.4, p.631-636, 1985.

BARENS, P.J.; KARIN, M. Nuclear factor-kappa B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *The New England Journal of Medicine*, v.336, p.1066-1071, 1997.

BARRIO, A. Giroxin, a new neurotoxin of *Crotalus durissus terrificus* venom. *Acta Physiol Latinoamericana*, v.11, p.24, 1961.

BHATTACHARYYA, S; DUDEJA, P.K.; TOBACMAN, J.K. Carrageenan-induced NFκB activation depends on distinct pathways mediated by reactive oxygen species and Hsp27 or by Bcl10. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1780: 973-982, 2008b.

BEUTLER, B. & CERAMI, A. The biology of cachectin/TNF--a primary mediator of the host response. *Annu Rev Immunol*, v.7, p.625-55, 1989.

BECK, I.M.; BERGHE, W.V.; VERMEULEN, L.; BOUGARNE, N.; CRUYSSEN, B.V. ; HAEGEMAN, G.; BOSSCHERK.. Altered subcelullar distribution of MSK1 induced by glucocorticoids contributes to NF-κB inhibition. *The EMBO Journal*, v.27, p. 1682-93, 2008.

BIFFL, W.L.; MOORE, E.E.; MOORE, F.A.; BARNETT, C. Nitric oxide reduces endothelial expression of intercellular adhesion molecule (ICAM-1). *J.Surg. Res*., v.63, p.328-332, 1996.

BLAKE, G.J.; RIDKER, P.M. Novel clinical markers of vascular wall inflammation. *Cir Res*, v.89, n.9, p.763-771, 2001.

BOCHNER BS, KLUNK DA, STERBINSKY SA, COFFMAN RL, SCHLEIMER RP. IL-13 selectively induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells. *Immunol.*,154 (2): 799-803, 1995.

BOGDAN, C. Macrophages. *In Encyclopedia of Life Sciences*, p.1-9, 2001.

BON, C.; CHANGEUX, J.P.; JENG, T.W.; FRANKEL-CONTRAT, H. Postsynaptic effects of crotoxin and of its isolated subunits. *Eur J Biochem*, v.99, n.3, p.471-481, 1979.

BONNANS, C.; VACHIER, I.; CHAVIS, C.; GODARD, P.; BOUSQUET, J.; CHANEZ, P. Lipoxins are potential endogenous anti-inflammatory mediators in asthma. *Am. J. Respir. Crit Care Med*, v.165, p.1532-1535, 2002.

BORTHAKUR, A.; BHATTACHARYYA, S.; DUDEJA, P.K.; TOBACMAN, J.K. Carrageenan induces NFκB activation and interleukin-8 production in normal human colonic epithelial cells. *Am. J.Physiol.: Gastrointest. Liver Physiol*, 292: G829-838, 2007.

BREITHAUPT, H. Enzymatic characteristics of *Crotalus* phospholipase A_2 and the crotoxin complex. *Toxicon*, v.14, p.221-233, 1976.

CARDOSO, D.F.; MOTA, I. Effect of *Crotalus* venom on the humoral and cellular immune response. *Toxicon*, v.35, p.607-612, 1997.

CARDOSO, D.F.; LOPES-FERREIRA, M.; FAQUIM-MAURO, E.L.; MACEDO, M.S.; FARSKY, S.H. Role of crotoxin, a phospholipase A_2 isolated from *Crotalus durissus terrificus* snake venom, on inflammatory and immune reactions. *Mediators Inflamm*, v.10, n.3, 125-33, 2001.

CARMAN, C.V. Mechanisms for trasncelullar diapedesis: probing and pathfinding by invadosome-like protusions. *J. Cell. Sci*., v.122, p.3025-35, 2009.

CAVAILLON, J.M. Pro- versus anti-inflammatory cytokines: myth or reality. *Cell Mol Biol*, 47 (4): 695-702, 2001.

CHEN, S.R.; XU, X.Z. WANG, Y.H.; CHEN, J.W.; XU, S.W. Icariin derivative inhibits inflammation through suppression of p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-κB pathways. *Biol. Pharma. Bull*., 33 (8): 1307-1313, 2010.

CERQUEIRA, N.F.; YOSHIDA, W.B. Oxido nítrico – Revisão. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v.17, n.6, p.417, 2002.

CHISARI, A.; SPINEDI, E.; VOIROL, M.J.; GIOVAMBATTISTA, A.; GAILLARD, R.C. A phosphopliase A_2-related snake venom (from *Crotalus durissus terrificus*) stimulates neuroendocrine and immune functions: determination of different sites of action. *Endocrinology*, v.139, n.2, p.617-25, 1998.

CHOSAY, J.G.; FISCHER, M.A.; FARHOOD, A.; READY, K.A.; DUNN, C.J.; JAESCHKE, H. Role of PECAM-1 (CD31) in neutrophil transmigration in murine models of liver and peritoneal inflammation. *American J Physiol Gastrointest Liver* Physiol, v.274, p.776-782, 1998.

CLARIA, J.; SERHAN, C.N. Aspirin triggers previously undescribed bioactive eicosanoids by human endothelial cell-leukocyte interactions. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.95, n.21, p. 9475-9, 1995.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. *Robbins pathologic basis of disease*. 6 ed. USA-Saunders Company, p.69-75, 1999.

CUZZOCREA, S.; SAUTEBIN, L.; DE SARRO, G.; COSTANTINO, G.; ROMBOLA, L.; MAZZON, E.; IALENTI, A.; DE SARRO, A.; CILIBERTO, G.; DI ROSA, M.; CAPUTI, A.P., THIEMERMANN, C. Role of IL-6 in the pleurisy and lung injury caused by carrageenan. *J Immunol*, v.163 p.5094-5104, 1999.

CUZZOCREA, S.; CRISAFULLI, C.; MAZZON, E.; ESPOSITO, E.; MUIÁ, C.; ABDELRAHMAN, M.; DI PAOLA, R., THIEMERMANN, C. Inhibition of glycogen synthasekinase-3β attenuates the development of carrageenan induced lung injury in mice. *British Journal of Pharmacology***,** v.149, p.687-702, 2006.

DALMARCO, E.M.; MEDEIROS, Y.S.; FRÖDE, T.S. Cyclosporin A inhibits CD11a/CD18 adhesion molecules due to inhibition of TNF-α and IL-1β levels in the mouse model of pleurisy induced by carrageenan. *Cell adhesion & Migration*, v.2 n.4 p.231-235, 2008.

DAL SECCO, D.; PARON, J.A.; OLIVEIRA, S.H.P.; FERREIRA, S.H.; SILVA, J.S.; CUNHA, F.Q. Neutrophil migration in inflammation: nitric oxide inhibits rolling, adhesion and induced apoptosis. *Nitric Oxide: Biol. Chem*., v.9, p.153-164, 2003.

DAL SECCO, D.; MOREIRA, A.P.; FREITAS, A.; SILVA, J.S.; ROSSI, M.A.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Nitric oxide inhibits neutrophil migration by a mechanism dependent on ICAM-1: Role of soluble guanylate cyclase. *Nitric Oxide*, v.15, n.1, p.77-86, 2006.

DE LISSER, H.M.; NEWMAN, P.J.; ALBELDA, S.M. Molecular and functional aspects of PECAM-1/CD31. *Immuno Today*, v.15, n.10, p.490-495, 1994.

DE RUITER, G.A.; RUDOLPH, B. Carrageenan biotechnology. *Trends Food Sci Technol*, v.8, p.389-95, 1997.

DIAMOND, P.; MCGINTY, A.; SUGRUE, D.; BRADY, H.R.; GODSON, C. Regulation of leukocyte trafficking by lipoxins. *Clin Chem Lab Med*, v.37, n.3, p.293-297, 1999.

DINARELLO, C.A. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*. v.87, n.6, p.2095-147, 1996.

DI ROSA, M.; GIROULD, J.P.; WILLOUGHBY, D.A. Studies of the acute inflammatory response induced in rats at different sites by carrageenan and turpentine. *J. Pathology*, v.104, p.15-29, 1971.

DUSSE, L.M.S.; VIEIRA, L.M.; CARVALHO, M.G. Revisão sobre óxido nítrico. *J.Bras. Patol Med Lab*, v.39, n.4, 2003.

EBNET, K.; VESTWEBER, D. Molecular mechanisms that control leukocyte extravasation: the selectins and the chemokines. *Histochem Cell Biol*, v.112, n.1, p.1-23, 1999.

EPPIHIMER, M.J.; WOLITZKY, B.; ANDERSON, D.C.; LABOW, M.A.; GRAGER, D.N.Heterogeneity of expression of E and P selectins in vivo. *Circ Res*, v.79, n.3, p.560-9, 1996.

ENIOLA-ADEFESO, O; HUANG, R.B.; SMITH, C.W. Kinetics of LFA-1 mediated of human neutrohils to ICAM-1-role of E-selectin signaling post-activation. *Ann. Biomed. Eng*., v. 37, n.4, p.737-48, 2009.

FAURE, G.; XU, H.; SAUL, F.A. Crystal Structure of Crotoxin Reveals Key Residues Involved in the Stability and Toxicity of This Potent Heterodimeric β-neurotoxin. *J Mo. Biol*, v. 412, p.176-101, 2011.

FERREIRA, S.H.; VANE, J.R. The continuous bioassay of the release and disappearance of histamine in the circulation. *Br J Pharmacol*, v.49, p.443-53, 1973.

FIERRO, I.M.; SERHAN, C.N. Mechanisms in anti-inflammation and resolution: the role of lipoxins and aspirin-triggered lipoxins. *Braz J Med Biol Res*, v.34, n.5, p.55-66, 2001.

FIORE, S.; SERHAN, C.N. Lipoxin A_4 receptor activation is distinct from that of the formyl peptide receptor in myeloids cells: inhibition of CD11/18 expression by lipoxin A_4-lipoxin A_4 receptor interaction. *Biochemistry*, v.34, n.51, p.16678-16686, 1995.

FRÖDE, T. S.; Souza, G.E.P.; Calixto, J.B. The modulatory role played by TNF-α and IL-1β in the inflammatory responses induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. *Cytokine*, v.13, n.3 p.162-168, 2001.

GAUTHIER, T.W.; DAVENPECK, K.L.; LEFER, A.M. Nitric oxide attenuates leukocyte-endothelial interaction via P-selectin in splachnic ischemia-reperfusion. *Am. J. Physiol*, v.267, p.G562-G568., 1994.

GODSON, C.; MITCHELL, S.; HARVEY, K.; PETASIS, N.; HOGG, N.;BRADY, H. Cutting edge: lipoxins rapidly stimulate nonphlogistic phagocytosis of apoptotic neutrophils by monocyte-derived macrophages. *J Immunol***,** v.164, p.1663-1667, 2000.

GOPALAKRISHNAKONE, P.; DEMPSSTER, D.W.; HAWGOOD, B.J; ELDER, H.Y. Cellular and mitochondrial changes induced in the structure or murine skeletal muscle by crotoxin, a neurotoxic phospholipase A_2. *Toxicon*, v.22, n.1, p. 85-98, 1984.

GUTIERREZ, J.M.; LOMONTE, B. Local tissue damage induced by Bothrops snakes venoms. A review. *Mem Inst Butantan*, v.51, p.211–223, 1989.

HABERMANN, E.; BREITHAUPT, H. Mini-review the crotoxin complex- an example of biochemical ahd pharmacological protein complementation. *Toxicon*, v.16, p.19, 1978.

HARIZI, H.; CORCUFF, J.B.; GUALDE, N. Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. *Trends in Molecular Medicine*, v.14, n.10, p. 461-469, 2008.

HARRIS, S.G. et al. Prostaglandins as modulators of immunity. *Trend Immunol*, v.23, p.144-150, 2002.

HAWGOOD, B.J.; SANTANA DE SÁ, S. Changes in spontaneous and evoked release IF transmitter induced by the crotoxin complex and its component phospholipase A_2 at the frog neuromuscular junction. *Neuroscience*, v.4, p.293-303, 1979.

HAWGOOD, B.J.; BON, C. Snake venom presynaptic toxins. In: Tu, A.T. (Ed), *Handbook of Natural Toxins: Reptile Venoms and Toxins, Marcel Dekker*, New York, p.3-52, 1991.

HENDON, R.A.; BIEBER, A.L. Presynaptic toxins from rattlesnake venoms. In: Tu, A.T. (Ed.), *Rattlesnake Venoms: Their Actions and Treatment. Marcel Dekker*, New York, p. 211-246, 1982.

HEWETT, J.A.; ROTT, R.A. Hepatic and extrahepatic pathobiology of bacterial lipopolysaccharides. *Pharmacol Reviews*, v.45, p.382-411, 1993.

IALENTI, A.; IANARO, A.;MAFFIA, P.; SAUTEBIN, L.; DI ROSA, M. Nitric oxide inhibits leukocyte migration in carrageenan-induced rat pleurisy. *Inflammation Res*., v.49,p.411-417, 2000.

IWATA, M.; SUZUKI, S.; ASAI, Y.; INOUE, T.; TAKAGI, K. Involvement of nitric oxide in a rat modelo f carragenin-induced pleurisy. *Mediators of inflammation*, 2010, ID 682879, 2010.

JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P. The immune system in trealth and disease. In: *Immunobiology*. New York, ed. Current Biology / Garland Publishing, p.12-16, 1994.
JORGE, M.T.; RIBEIRO, L.A. Epidemiologia e quadro clínico d acidente por cascavel sul-americana (*Crotalus durissus*). *Rev Inst Trop* São Paulo, v.34, n. 4, p.374-354, 1992.

KAM, P.C.A.; SEE, A.U.L. Cyclo-oxygenase isoenzymes: physiological and pharmacological role. *Anaesthesia*, v.55, p.442-449, 2000.

KINASHI, T. Intracellular signaling controlling integrin activation in lymphocytes. *Nature Reviews Immunology*, v.5, p.546-559, 2005.

KINI, R.M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A_2 enzymes. *Toxicon*, v.42, p,827-840, 2003.

KNOWLES, R.G.; MONCADA, S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J*, v.298, p.249-258, 1995.

KÖLSCH, V.; CHAREST, P.G., FIRTEL, R.A. The regulation of cell mobility and chemotaxis by phospholipid signaling. *J. Cell Sci*, 121: 551-559, 2008.

KOPP, E.B.; GHOSH, S. NF-kappa B and rel proteins in innate immunity. *Advances in Immunology*, v.58, p.1-27, 1995.

KUBES, P.; MCCAFFERTY, D.M. Nitric oxide and intestinal inflammation. *The American Journal of Medicine*, v.109, p.150-158, 2000.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. Inflamação aguda e crônica. In: Robbins & Cotran – Bases Patológicas das Doenças. São Paulo, Editora Elsevier, 8ª edição, 2010.

KVIETYS, P.; GRANGER, D.N. Role of reactive oxygen and nitrogen species in the vascular responses to inflammation. *Free Radical Biology & Medicine*, v.52, p.556-592, 2012.

LANDUCCI, E.C.; ANTUNES, E.; DONATO, J.L.; FARO, R.; HYSLOP, S.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; CIRINO, G.; DE NUCCI, G. Inhibition of carrageenin-induced rat paw oedema by crotapotin, a polypeptide complexed with phospholipase A_2. *Br J Pharmacol*, v.114, p.578-583, 1995.

LANDUCCI, E.C.; TOYAMA, M.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; CIRINO, G., ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. Effect of crotapotin and heparin on the rat paw oedema induced by different secretory phospholipases A_2. *Toxicon*, v.38, p.199-208, 2000.

LAWSON, C.; WOLF, S. ICAM-1 signaling in endothelial cells. Pharmacological Reports, v.61, p.22-32, 2009.

LEWIS, R.A.; AUSTEN, K.F. Leucotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway. Biochemistry and relation to pathobiology in human diseases. *N Engl J Med*, v.323, p.645-655, 1990.

LEY, K.; LAUDANNA, C.; CYBULSKY, M.I.; NOURSHARGH, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature Reviews Immunology*, v.7, p.678-689, 2007.

LI, Z.P.; HU, J.F.; SUN, M.N.; JI, H.J.; ZHAO, M.; WU, D.H.; LI, G.Y.; LIU, G.; CHEN, N.H. Effect of compound IMMLG5521, a novel coumarin derivative, on carrageenan-induced pleurisy in rats. *European Journal of Pharmacology*, v.661, p.118-123, 2011.

LIMA, T.S.; NUNES, F.B.; SAMPAIO, S.C.; SOUZA-E-SILVA, M.C.C. Efeito do veneno de *Crotalus durissus terrificus* sobre a fagocitose por neutrófilos no modelo de peritonite. In: *39º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental*, Ribeirão Preto, 2007.

LUO, P.; WONG, Y.F.; GE, L.; ZHANG, Z.F.; LIU, Y.; LIU, L.; ZHOU, H. Anti-inflammatory and analgesic effect of plumbagin through inhibition of nuclear factor-κB activation. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v.335, p.735-742, 2010.

MAGALHÃES, R.A.; RIBEIRO, M.M.F.; REZENDE, N.A.; AMARAL, C.F.S. Rabdomiólise secundária a acidente ofídico crotálico (*Crotalus durissus terrificus*). *Rev Inst Med Trop*, São Paulo, v.28, n.4, p.228-233, 1986.

MAJNO, G.; JORIS, I. Inflammation: The actors and their language. In: *Cells, tissues and disease*. Principles of general pathology. 2 ed. Nova York: Oxford University Press, p.307-382, 2004.

MARIOTTO, S.; ESPOSITO, E.; DI PAOLA, R.; CIAMPA, A.; MAZZON, E.; DE PRATI, A.C.; DARRA, E.; VINCENZI, S.; CUCINOTTA, G.; CAMINITI, R.; SUZUKI, H.; CUZZOCREA, S. Protective effect of Arbutus unedo aqueous extract in carrageenan-induced lung inflammation in mice. *Pharmacological Research*, v.57, p.110-124, 2008.

MAZZON, E.; ESPOSITO, E.; DI PAOLA, R.; MUIA, C.; CRISAFULLI, C.; GENOVESE, T.; CAMINITI, R.; MELI, R.; BRAMANTI, P.; CUZZOCREA, S. Effect of tumour necrosis factor-α receptor 1 genetic deletion on carrageenan-induced acute inflammation: a comparison with etanercept. *Clinical & Experimental Immunology*, v.153 p.136-149, 2008.

MCMAHON, B.; MITCHELL, S.; BRADY, H.R.; GODSON, C. Lipoxins: revelations on resolution. *Trends Pharmacol Sci*, v.22, n.8, p.391-5, 2001.

MELGAREJO, A.R. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: CARDOSO, J.L.; FRANÇA, F.O.; FAN, H.W.; MÁLAQUE, C.M.; HADDAD, V. *Animais peçonhentos no Brasil: biologia clínica e terapêutica dos acidentes*. São Paulo, Editora Savier, p.33-61, 2003.

MIN, S.W.; PARK, Y.J.; KIM, D.H. Kakkalide and its metabolite irisolidone ameliorate carrageenan-induced inflammation in mice by inhibiting NF-κB pathway. *Inflammation*, v.34, n.5, 2010.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGFS, E.A.Nitric oxide: physiolgy, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev*, v.43, p.109-142, 1991.

MOURA-GONÇALVES, J.; VIEIRA,A. Estudo sobre veneno de serpentes brasileiras. I. Análise eletroforética. *An Acad Bras Ciênci*, v.22, p.141-150, 1950.

MULLER, W.A. Mechanisms of Transendothelial Migration of Leukocytes. *Circ Res*, v.105, p.223-230, 2009.

MULLIGAN, MS; LENTSCH, AB; WARD, PA. Cytokine and adhesion molecule requirementes for neutrophil recruitment during glycogen-induced peritonitis. *Inflammat Res*, v.47, p.251-255, 1998.

NAKAMURA, M.C.; FERREIRA, S.H. A pheripheral sympathetic component in inflammatory hyperalgesia. *Eu J Pharmacol*, v.135 p.145-153, 1987.

NUNES, F.P.B.; SAMPAIO, S.C.; SANTORO, M.L.; SOUSA-E-SILVA, M.C.C. Long-lasting anti-inflammatory properties of *Crotalus durissus terrificus* snake venom in mice. *Toxicon*, v.49, p.1090-1098, 2007.

NUNES, F.P.B; ZYCHAR, B.C.; DELLA-CASA M.S.; GONÇALVES, L.R.C.; CIRILLO, M.C. Crotoxin is responsible for the long-lasting anti-inflammatory effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom: Involvement of formyl peptide receptors. *Toxicon*, v.55, p.1100-1106, 2010.

OWNBY, L.C.; CAMERON, D.; TU, A.T. Isolation of mytoxic component from rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venon. *Am J Pathol*, v.85, n.1, p.149-166, 1976.

PETERS-GOLDEN, M.; CANETTI, C.; MANCUSO, M.; COFFEY, M.J. Leukotrienes: Underappreciated mediatorsof Innate Imune Response. *The Journal of Immunology*, v.174, n.2, p.589-594, 2005.

PETERS-GOLDEN, M.; HENDERSON, W.R. Leucotrienes. *The New England Journal of Medicine*, v.357, n.18, p.1841-1854, 2007.

POSADAS, I.; BUCCI, M.; ROVIEZZO, F.; ROSSI, A.; PARENTE, L.; SAUTEBIN, L.; CIRINO, G. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. *Br J Pharmacol*, v.142, p.331-338, 2004.

PRADO-FRANCESQUI, J.; BRAZIL, O.V. Convulxin, a new toxin from the venom of the South American rattlesnake venom, on platelets and leukocytes of anesthetized rabbits. *Toxicon*, v.19, n.5, p.661-666, 1981.

PRIVRATSKY, J.R.; NEWMAN, D.K.; NEWMAN, P.J. PECAM-1: Conflicts of interest in inflammation. *Life Sciences*, v.87, p.69-82, 2010.

RANGEL-SANTOS, A.; LIMA, C.; LOPES-FERREIRA, M.; CARDOSO, D.F. Immunosuppresive role of principal toxin (crotoxin) of *Crotalus durissus terrificus* venom. *Toxicon*, v.44, n.6, p.609-616, 2004.

RANKIN, J.A. Biological mediators of acute inflammation. *AACN Clinical issues*, v.15, n.1, p.3-17, 2004.

RAW, I.; ROCHA, M.C.; ESTEVES, M.I.; KAMIGUTI, A.S. Isolation and characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of *Crotalus durissus terrificus*. *Braz. J Med Biol Res*, v.19, n.3, p.333-338, 1986.

ROITT, I.M.; BROSTOFF, J.; MALE, D.K. *Imunologia*. 5 ed. Manole, p.61-69,1999.

ROCHA e SILVA, M.; GARCIA-LEME, J. Chemical mediators of the acute inflammatory reaction. Oxford: Pergamon Press, p.1-47, 1972.

ROSE, D.M.; ALON, K.; GINSBERG, M.H. Integrin modulation and signaling in leukocyte adhesion and migration. *Imunol. Rev.*, v.218, p.126-34, 2007.

ROSENFELD, G. Syntomatology, Pathology and Treatment of snake bites in South America. In: Bücherl, W. And Buckley, E. (Eds). *Venomous Animals and Their Venoms*. New York, Academic Press, v.2, p.345-384, 1971.

SAMPAIO, S.C.; SOUSA-E-SILVA, M.C.C.; BORELLI, P.; CURI, R.; CURY, Y. *Crotalus durissus terrificus* snake venom regulates macrophage metabolism and function. *J Leukoc Biol*, v.70, n.4, p.551-558, 2001.

SAMPAIO, S.C.; BRIGATTE, P.; SOUSA-E-SILVA, M.C.C.; DOS-SANTOS, E.C.; RANGEL-SANTOS, A.C.; CURI, R.; CURY, Y. Contribution of crotoxin for the inhibitory effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom on macrophage function. *Toxicon*, v.41, n.7, p.899-907, 2003.

SAMPAIO, S.C.; RANGEL-SANTOS, A.C.; PERES, C.M.; CURI, R.; CURY, Y. Inhibitory effect of phospholipase A_2 isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom on macrophage function. *Toxicon*, v.45, p.671-676, 2005.

SAMPAIO, S.C.; ALBA-LOUREIRO, T.C.; BRIGATTE, P.; LANDGRAF, R.G.C.; DOS SANTOS, E.C.; CURI, R.; CURY, Y. Lipoxygenase-derived eicosanoids are involved in the inhibitory effect of *Crotalus durissus terrificus* venom or crotoxin on rat macrophage phagocytosis. *Toxicon*, v.47, p.313-321, 2006.

SAMPAIO, S.C.; HYSLOP, S.; FONTES, M.R.M.; PRADO-FRANCESCHI, J.; ZAMBELLI, V.O.; MAGRO, A.J.; BRIGATTE, P.; GUTIERREZ, V.P.; CURY, Y. Crotoxin: Novel activities for a classic β-neurotoxin. *Toxicon*, v.55, p.1045-1060, 2010.

SANO-MARTINS, I.S.; TOMY, S.C.; CAMPOLINA, D.; DIAS, M.B.; DE CASTRO, S.C.B.; SOUZA-E-SILVA, M.C.C.; AMARAL, C.F.S.; REZENDE, M.A.;KAMIGUTI, A.S.; WARRELL, D.A.; THEAKSTON, R.D.G. Coagulopathy following lethal and non-lethal envenoming of humans by the South American rattlesnake in Brazil. *Q J M*, v.94, n.10, p.551-559, 2001.

SEREZANI, C.H.; CHUNG, J.; BALLINGER, M.N.; MOORE, B.B.; ARONOFF, D.M.; PETERS-GOLDEN, M. Prostaglandin E_2supresses bacterial killing in alveolar macrophages by inhibiting NADPH oxidase. *Am J Respir Cell Mol Biol*, v.37, p.562-570, 2007.

SERHAN, C.N.; HAMBERG, M.; SAMUELSSON, B. Trihydroxytetraenes: a novel series of compounds formed from arachidonic acid in human leukocytes. *Biochem. Biophys. Res Commun*, v.118, n.3, p.943-949, 1984.

SERHAN, C.N. Lipoxins and aspirin-triggered 15-epi-lipoxins are the first lipid mediators of endogenous anti-inflammation and resolution. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, v.73, p.141-62, 2005.

SERHAN, C.N.; CHIANG, N. Endogenous pro-resolving and anti-inflammatory lipid mediators: a new pharmacologic genus. *British Journal of Pharmacology*, v.153, p.5200-5215, 2008.

SERHAN, C.N.; SHEPPARD, K.A. Lipoxin formation during human neutrophil-platelet interactions. Evidence for the transfmoration of leukotriene A_4 by platelet 12-lipoxygenase in vitro. *J Clinic Invest*, v.85, p.772-780, 1990.

SIMON, S.I.; GREEN, C.E. Molecular mechanics and dynamics of leukocyte recruitment during inflammation. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 7: 151-185, 2005.

SINAN. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Ministério da Saúde.www.saude.gov.br/sinanweb/. Acesso em fevereiro de 2012.

SLOTTA, K.H.; FRAENKEL-CONRAT, H. Estudos químicos sobre os venenos ofídicos. Purificação e cristalização do veneno da cobra cascavel. *Memórias Instituto Butantan*, v.12, p.505-512, 1938.

SMYTH, MJ, JOHNSTONE, R.W. Role of TNF in lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Microsc Res Tech*, v.50, n.3, p.196-208, 2000.

SOUSA-E-SILVA, M.C.C.; GONÇALVES, L.R.C.; MARIANO, M. The venom of South American rattlesnakes inhibits macrophage functions and is endowed with anti-inflammatory properties. *Mediators Inflamm.*, v.5, p.18-23, 1996.

SOUSA-E-SILVA, M.C.C.; TOMY, S.C.; TAVARES, F.L.; NAVAJAS, L.C.; LARSSON, N.H.M.A.; LUCAS, S.R.R.; KOGIKA, M.M.;SANO-MARTINS, I.S. Hematological, hemostatic and clinical chemistry disturbances induced by *Crotalus durissus terrificus* snake venom in dogs. *Hum Exp Toxicol*, v.22, n.9, p.491-500, 2003.

SPPÖRRI, B.; BICKEL, M.; DOBBELAERE, D. MACHADO, J.JR.; LOTTAS, D. Soluble interleukin-1 receptor – reverse signaling in innate immunoregulation. *Cytokine and Growth Factor Review*, v.12 p.27-32, 2001.

TAKESHITA, K.; BACON, K.B.; GANTNER, F. Critical role of L-selectin and histamine H4 receptor in Zymosan-induced neutrophil recruitment from the bone marrow: Comparison with carrageenan. *The Journal of Paharmacology and Experimental Therapeutics*. v.330, n., p.272-280, 2004.

TEDGUI, A.; MALLAT, Z. Anti-inflammatory mechanisms in the vascular wall. *Circ Res*, v.88, p.877-887, 2001.

TSUJI, R.F.; HOSHINO, K.; NORO, Y.; TSUJI, N.M.; KUROKAWA, T.; MASUDA, T.; AKIRA, S.; NOWAK, B. Supression of allergic reaction by λ-carrageenan: Toll-like receptor-4/MyD88-dependent and –independent modulation of immunity. *Clin Exp Allergy*, v.33, p.249-258, 2003.

UTSUNOMIYA, I.; NAGAI, S.; OH-ISHI, S. Sequential appearance of IL-1 and IL-6 activities in rat carragenin-induced pleurisy. *J Immunol*, v.147, p.1803-1809, 1991.

VAN ARMAN, C.G. In: VANE, J.R.; FERREIRA, S.H. *Anti-inflammatory drugs*. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, cap.21, 82p, 1979.

VINEGAR, R.;TRUAX, J.F.;SELPH, J.L. Some quantitative temporal characteristics of carregeenin-induced pleurisy in the rat**.** *Proc Soc Exp Biol Med*, 143: 711-714, 1973.

VINEGAR, R.; TRUAX, J. F.; F.A. Pathway of onset, development, and decay of carrageenan pleurisy in the rat. *Fed. Proc*. v.41, n.9, p.2588-95, 1982.

VITAL BRASIL, O.; EXCELL, B.J. Action of crotoxin and crotoctin from the venom of *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) on the frog neuromuscular junction. *J Physiol Lond*, v.212, p.34, 1971.

WALZOG, B.; GAEHTGENS, P. Adhesion molecules: the path to a new understanding of acute inflammation. *News Physiol Sci*, v.15, p.107-113, 2000.

WALLACE, J.L., CHAPMAN, K., MCKNIGHT, W. Limited anti-inflammatory efficacy of cyclo-oxygenase-2-inhibition in carrageenan-airpouch inflammation. *British Journal of Pharmacology*, v.126, p.1200-1204, 1999.

WARREN, I.S.; WARD, P.A.; JOHNSON, K.J. Tumor necrosis factor: a pluri-functional mediator of acute inflammation. *Mod. Pathol.*, 1: 242-7, 1988.

WATSON, W.H.; ZHAO, Y.; CHAWLA, R.K. S-adenosylmethionine attenuates the lipopolydaccharide-induced expressin of the gene for tumour necrosis factor alpha. *The Biochemical Journal*, v.342, p.21-25, 1999.

WINTER, C.A.; RISLEY, E.A.; NUSS, G.W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiiflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol Med*, 111: 544-547,1962.

WOODFIN, A.; BENOIT V.; NOURSHARGH, S. PECAM-1: A muti-functional molecule in inflammation and vascular biology. *Arteorscler ThrombVasc Biol*, v.27, n.12, p.2514-23, 2007.

WOODFIN, A.; VOISIN, M.B.; NOURSHARGH, S. Recent developments and complexities in neutrophil transmigration. *Curr. Opin. Hematol.*, v.17, n.1, p.9-17, 2010.

WON, J.H.; IM, H.T.; KIM, Y.H.; YUN, K.J.; PARK, H.J.; CHOI, J.W.; LEE, K.T. Anti-inflammatory effect of buddlejasaponin IV through the inhibition of iNOS and COX-2 expression in RAW 264.7 macrophages via the NF-kappaB inactivation. *Brithish Journal of Pharmacology*, v.148, p.216-225, 2006.

ZARBOCK, A.; LEY, K. Mechanisms and consequences of neutrphil interaction with the endothelium. *Am. J. Pathol.*, v.172, p.1-7, 2008.

ZHU, Q.; WU, D.C.; ZHOU, X.P.; GONG, S.; CHENG, B.C.; QIN, Z.H. Inhibitory effect of crotoxin on the pain-evoked discharge of neurons in thalamic parafascicular nucleus in rats. *Toxicon*, v.51, p.102-111, 2008.