

Fernanda Peixoto Barbosa Nunes

Efeito do veneno de serpentes *Crotalus durissus terrificus* e da crotoxina sobre a resposta inflamatória induzida por carragenina em camundongos

**São Paulo
2007**

Fernanda Peixoto Barbosa Nunes

Efeito do veneno de serpentes *Crotalus durissus terrificus* e da crotoxina sobre a resposta inflamatória induzida por carragenina em camundongos

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

Orientadora: Maria Cristina Cirillo de Sousa-e-Silva

**São Paulo
2007**

Ficha Catalográfica

Nunes, Fernanda

Efeito do veneno de serpentes *Crotalus durissus terrificus* e da crotoxina sobre a resposta inflamatória induzida por carragenina em camundongos
105p

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia

1. *Crotalus durissus terrificus* 2. Inflamação 3. 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)

Dedicatórias

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

Dedico este trabalho

A Deus,

*Por toda a proteção e saúde.
Por guiar cada passo da minha vida.
Por me presentear com mais essa conquista.*

A todos os animais utilizados,

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

Aos meus queridos avós Ruth e Geraldo,

*Esse trabalho é uma singela homenagem para duas pessoas que serão amadas por toda a eternidade.
Apesar de todos os meus defeitos vocês sempre me colocaram no topo de um altar, e me mostraram que os meus grandes sonhos devem estar sempre em primeiro lugar.*

Aos meus amados pais Carlos e Sandra,

Exemplos de sabedoria, garra e honestidade. Os grandes exemplos da minha vida. Obrigada por todo amor e dedicação de todos esses anos. Graças aos ensinamentos transmitidos, me tornei uma pessoa de bem, de valores e uma grande guerreira. Amo vocês.

Ao meu lindo e querido irmão Gustavo,

*Eu e você 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 ter dividido comigo cada etapa cumprida deste trabalho.
Obrigada por estar ao meu lado "sempre".
Obrigada por ser o meu grande companheiro, o meu maior tesouro, o meu amor.*

“Aprender uma coisa significa entrar em contato com um mundo do qual não se tem a menor idéia. É preciso ser humilde para aprender”.

Paulo Coelho

À Cristina,

Agradeço imensamente pela sua orientação e paciência durante esses quatro anos de trabalho e convivência. Graças a todo esse tempo de convivência, hoje me sinto uma pessoa muito mais segura e preparada, em todos os sentidos, para dar continuidade ao que foi iniciado neste trabalho.

À Anita e Cíntia

Verdadeiras amigas que estiveram muito presentes durante todo esse tempo no Laboratório de Fisiopatologia. Pessoas queridas que sempre estiveram ao meu lado e que muito me ajudaram, tanto na minha vida profissional como na pessoal. Obrigada por tudo.

Agradecimentos

- ✓ À Bianca Zychar, pela colaboração extremamente importante para a conclusão deste trabalho e, com certeza, de muitos outros que estão por vir. Adorei trabalhar com você e com a Microscopia Intravital. Obrigada por tudo.
- ✓ À Dra. Ida Siqueira Sano-Martins, por permitir que eu desenvolvesse meu projeto no Laboratório de Fisiopatologia e por ter aceitado ser minha orientadora perante o Instituto de Biociências (USP), no início do mestrado. Muito Obrigada.
- ✓ Ao “mestre” Marcelo Santoro, pela ajuda incondicional durante o desenvolvimento do artigo científico e por todo conhecimento que vem transmitindo de uma maneira tão especial.
- ✓ À Dra. Sandra Sampaio, pela colaboração durante o desenvolvimento deste trabalho.
- ✓ Ao Norberto Carneiro Castro Junior, por estar sempre pronto a ajudar e pela nossa grande amizade.
- ✓ À Neusa, por ter sido a maior colaboradora na montagem final desta dissertação. Obrigada por toda a sua paciência, dedicação e amizade.

- ✓ *À Iracema e Neucely. Obrigada por toda ajuda e pela nossa convivência. A amizade de vocês é muito especial.*

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

- ✓ *Às amigas Andréa e Ana Beatriz, pela companhia durante as disciplinas da pós-graduação. Pela amizade tão especial e por todo apoio.*

- ✓ *Ao Dr. Gilberto Fernando Xavier e a todos do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.*

- ✓ *Ao Helder, Érica e Dona Teresa, da secretaria da Pós-graduação do Instituto de Biociências (USP). Extremamente prestativos e atenciosos.*

Índice

1. INTRODUÇÃO	001
1.1. Inflamação: considerações gerais.....	005
1.1.1. Eventos vasculares.....	006
1.1.2. Eventos celulares.....	007
1.1.3. Mediadores químicos da inflamação	010
1.1.4. Resolução da resposta inflamatória	012
1.2. A carragenina como agente flogístico.....	013
1.3. Drogas antiinflamatórias utilizadas em estudos experimentais.....	015
1.4. Efeitos do veneno de <i>Crotalus durissus terrificus</i> (VCdt) e da crotoxina (ctx) sobre a resposta inflamatória.....	017
2. OBJETIVO	020
3. MATERIAL E MÉTODOS	021
3.1. Animais.....	021
3.2. Veneno	021
3.3. Crotoxina	021
3.3.1. Isolamento e purificação da ctx	022
3.4. Planejamento geral	022
3.5. Protocolo experimental.....	023
3.5.1. Tratamento com o VCdt.....	023
3.5.2. Tratamento com a ctx	024
3.5.3. Tratamentos farmacológicos	024
3.6. Efeito do VCdt sobre a resposta inflamatória induzida pela carragenina	025
3.6.1. Desenvolvimento de edema de pata induzido por carragenina	025
3.6.2. Migração celular para a cavidade peritoneal induzida por carragenina	026
3.6.2.1. Contagem total e diferencial de células peritoneais	026
3.6.3. Interação leucócito-endotélio na microcirculação do músculo cremáster	027
3.7. Análises estatísticas.....	028

4. RESULTADOS.....	029
4.1. Desenvolvimento do edema de pata induzido por carragenina.....	029
4.1.1. Efeito do pré-tratamento com o VCdt sobre o desenvolvimento do edema de pata induzido por carragenina	029
4.1.2. Efeito do pós-tratamento com o VCdt sobre o desenvolvimento do edema de pata induzido por carragenina	030
4.1.3. Efeito dos tratamentos com VCdt, dexametasona, indometacina, nimesulide ou L-NAME sobre o desenvolvimento do edema de pata induzido por carragenina	031
4.2. Migração celular para a cavidade peritoneal induzida por carragenina	038
4.2.1. Efeito do pré-tratamento com o VCdt, administrado pela via subcutânea, sobre a migração celular induzida por carragenina	038
4.2.2. Efeito do pós-tratamento com o VCdt, administrado pela via subcutânea sobre a migração celular induzida por carragenina	039
4.2.3. Efeito dos tratamentos com VCdt, dexametasona, indometacina ou nimesulide, administrados pela via subcutânea, sobre a migração celular induzida por carragenina.....	039
4.2.4. Efeito do pré-tratamento com o VCdt, administrado pela via oral, sobre a migração celular induzida por carragenina.....	040
4.2.5. Efeito do pós-tratamento com o VCdt, administrado pela via oral, sobre a migração celular induzida por carragenina	041
4.3. Interação leucócito-endotélio na microcirculação do músculo cremaster de camundongos, avaliado por microscopia intravital.	048
4.3.1. Efeito do pré-tratamento com o VCdt sobre a interação leucócito- endotélio na microcirculação do músculo cremaster de camundongos.....	048

4.3.2. Efeito do pós-tratamento com o VCdt sobre a interação leucócito-endotélio na microcirculação do músculo cremaster de camundongos.....	054
4.4. Efeito da ctx sobre a resposta inflamatória induzida por carragenina	057
4.4.1. Efeito do pré-tratamento com a ctx, administrada pela via subcutânea, sobre o desenvolvimento do edema de pata induzido por carragenina	058
4.4.2. Efeito do pós-tratamento com a ctx, administrada pela via subcutânea, sobre o desenvolvimento do edema de pata induzido por carragenina	058
4.4.3. Efeito do pré-tratamento com a ctx, administrada pela via subcutânea, sobre a migração celular induzida por carragenina	061
4.4.4. Efeito do pós-tratamento com a ctx, administrada pela via subcutânea, sobre a migração celular induzida por carragenina	061
4.4.5. Efeito do pré-tratamento com a ctx administrada pela via subcutânea sobre a interação leucócito-endotélio na microcirculação do músculo cremaster de camundongos.....	064
4.4.6. Efeito do pós-tratamento com a ctx administrada pela via subcutânea sobre a interação leucócito-endotélio na microcirculação do músculo cremaster de camundongos....	067
5. DISCUSSÃO	070
6. RESUMO DOS RESULTADOS	081
7. CONCLUSÃO	083
8. RESUMO	084
9. ABSTRACT	085
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	086
11. APÊNDICES.....	106

Índice de tabelas e figuras

Tabela 1. Efeito do pré e pós-tratamento com VCdt, administrado pela via subcutânea, sobre a migração celular induzida por carragenina	043
Tabela 2. Efeito do VCdt e de outras drogas antiinflamatórias sobre a migração celular induzida por carragenina	045
Tabela 3. Efeito do pré e pós-tratamento com VCdt, administrado por via oral sobre a migração celular induzida por carragenina	047
Figura 1. Serpente <i>Crotalus durissus terrificus</i>	002
Figura 2. Efeitos sistêmicos (A,B e C) e ausência de efeitos locais (D e E) decorrentes do envenenamento por serpentes <i>Crotalus durissus terrificus</i>	004
Figura 3. Efeito do pré-tratamento com o VCdt sobre o edema de pata induzido por carragenina (14 dias).	032
Figura 4. Efeito do pré-tratamento com o VCdt sobre o edema de pata induzido por carragenina (7 dias).	033
Figura 5. Efeito do pré-tratamento com o VCdt sobre o edema de pata induzido por carragenina (1 h).	034
Figura 6. Efeito do pós-tratamento com o VCdt sobre o edema de pata induzido por carragenina (1 h).	035
Figura 7. Efeito do pós-tratamento com o VCdt sobre o edema de pata induzido por carragenina.....	036
7A. Pós-tratamento - 4 h	036
7B. Pós-tratamento - 48 h	036
Figura 8. Efeito do tratamento com o VCdt e outras drogas antiinflamatórias sobre o edema de pata induzido por carragenina.....	037
Figura 9. Efeito do pré-tratamento com o VCdt sobre a interação leucócito-endotélio, induzida por carragenina, na microcirculação do músculo cremaster. Avaliação dos leucócitos em <i>rolling</i> , aderidos e migrados	050
Figura 10. Efeito da injeção de salina sobre a interação leucócito-endotélio da microcirculação do músculo cremaster de camundongos	051
Figura 11. Efeito da injeção de carragenina sobre a interação leucócito-endotélio na microcirculação do músculo cremaster de camundongos	052

Figura 12. Efeito do pré-tratamento com o VCdt sobre a interação leucócito-endotélio, induzida por carragenina, na microcirculação do músculo cremaster de camundongos.	053
Figura 13. Efeito do pós-tratamento com o VCdt sobre a interação leucócito-endotélio induzida por carragenina na microcirculação do músculo cremaster. Avaliação dos leucócitos em <i>rolling</i> , aderidos e migrados	055
Figura 14. Efeito do pós-tratamento com o VCdt sobre a interação leucócito-endotélio, induzida por carragenina, na microcirculação do músculo cremaster de camundongos	056
Figura 15. Efeito do pré-tratamento com a ctx sobre o desenvolvimento de edema de pata induzido por carragenina.....	059
Figura 16. Efeito do pós-tratamento com a ctx sobre o desenvolvimento de edema de pata induzido por carragenina.....	060
Figura 17. Efeito do pré-tratamento com a ctx sobre a migração celular induzida por carragenina.....	062
17A. Contagem total de leucócitos	062
17B. Contagem diferencial de leucócitos.....	062
Figura 18. Efeito do pós-tratamento com a ctx sobre a migração celular induzida por carragenina.....	063
18A. Contagem total de leucócitos	063
18B. Contagem diferencial de leucócitos.....	063
Figura 19. Efeito do pré-tratamento com a ctx sobre a interação leucócito-endotélio, induzida por carragenina, na microcirculação do músculo cremaster. Avaliação dos leucócitos em <i>rolling</i> , aderidos e migrados.	065
Figura 20. Efeito do pré-tratamento com a ctx sobre a interação leucócito-endotélio induzida por carragenina, na microcirculação do músculo cremaster de camundongos	066
Figura 21. Efeito do pós-tratamento com a ctx sobre a interação leucócito-endotélio, induzida por carragenina, na microcirculação do músculo cremaster Avaliação dos leucócitos em <i>rolling</i> , aderidos e migrados	068
Figura 22. Efeito do pós-tratamento com a ctx sobre a interação leucócito-endotélio induzida por carragenina, na microcirculação do músculo cremaster de camundongos	069

LISTA DE ABREVIATURAS

VCdt	veneno de <i>Crotalus durissus terrificus</i>
ctx	crotoxina
cg	carragenina
FLA ₂	fosfolipase A ₂
COX-1	ciclooxigenase-1
COX-2	ciclooxigenase-2
Dx	dexametasona
Ind	indometacina
Nime	nimesulide
L-Name	L-N ^G -nitro arginine methyl ester
sal	salina
via s.c.	via subcutânea
v.o.	via oral
mono	mononucleares
poli	polimorfonucleares
IL	interleucina
PGE ₂	prostaglandina E ₂
NOS	óxido nítrico sintetase

1. Introdução

As serpentes peçonhentas sempre estiveram presentes na vida do homem ao longo dos anos, sendo temidas por uns e adoradas por outros. Atualmente os acidentes ofídicos continuam sendo um grave problema de saúde pública pela sua alta freqüência e gravidade (Araújo *et al.*, 2003).

No Brasil, os envenenamentos ofídicos englobam aproximadamente 20.000 casos por ano, sendo que quatro são os gêneros de serpentes envolvidos nestes acidentes. O gênero *Bothrops* é o principal deles, sendo responsável por aproximadamente 90,5% do total de acidentes, seguido pelos gêneros *Crotalus* (7,7%), *Lachesis* (1,4%) e *Micrurus* (0,4%) (Ministério da Saúde, 1998).

As serpentes pertencentes ao gênero *Crotalus*, popularmente conhecidas como cascavéis, são serpentes robustas, ágeis e de hábitos terrestres. Estas serpentes são facilmente identificadas por apresentarem na extremidade caudal um guizo ou chocalho (Melgarejo, 2003).

No Brasil, o gênero é representado por uma única espécie, a *Crotalus durissus*, a qual apresenta uma vasta 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. Dentro dessa espécie, subdividem-se cinco subespécies: a *Crotalus durissus terrificus*, predominante das regiões Sudeste e Sul, sendo a principal responsável pelos acidentes notificados no país (Fig.1); a *Crotalus durissus collilineatus*, comum na região centro-oeste, se estendendo até o estado de Rondônia; a *Crotalus durissus cascavella*, a cascavel nordestina, e as menos conhecidas, tais como

a *Crotalus durissus ruruima* e a *Crotalus durissus marajoensis*, restritas às regiões das savanas do estado de Roraima e da Ilha de Marajó, respectivamente (Melgarejo, 2003).



Fig 1. Serpente *Crotalus durissus terrificus*

O veneno de *Crotalus durissus terrificus* (VCdt) é composto por uma mistura complexa de proteínas e polipeptídeos capazes de interferir em vários processos fisiológicos. O VCdt é classificado como 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 trombina-símile (thrombin-like) (Raw *et al.*, 1986).

A crotoxina (ctx) é o principal componente tóxico do VCdt, representando cerca de 60% do veneno total, além de ser a principal responsável pela neurotoxicidade deste veneno (Slotta & Fraenkel-Conrat, 1938; Breithaupt,

1976). Esta toxina é formada a partir da associação não covalente de duas subunidades: o componente A ou crotapotina e o componente B ou fosfolipase A₂. A interação entre as duas subunidades, fosfolipase e crotapotina, confere a ctx sua alta toxicidade (Habermann & Breithaupt, 1978).

O quadro de envenenamento humano causado pelas serpentes *Crotalus durissus terrificus*, caracteriza-se por manifestações sistêmicas, decorrentes da ação neurotóxica do veneno, tais como: ptose palpebral (Fig. 2A e 2C), paralisia flácida dos músculos esqueléticos e diminuição da motricidade ocular e acuidade visual (Rosenfeld, 1971). Ainda decorrente da atividade neurotóxica do veneno, pode ser observado quadro de insuficiência respiratória, uma manifestação importante presente em casos graves (Amaral *et al.*, 1991). Além disso, devido à atividade miotóxica do VCdt, os pacientes apresentam quadro de rabdomiólise generalizada e conseqüente mioglobínúria (Fig. 2B) (Azevedo-Marques *et al.*, 1985, 1987; Magalhães *et al.*, 1986; Santoro *et al.*, 1999). Esses efeitos, associados a outros fatores como desidratação e hipotensão, podem provocar insuficiência renal aguda com comprometimento de néfrons, (Amorim *et al.*, 1969), principal causa de óbito nesses envenenamentos (Amaral *et al.*, 1986).

Apesar dos efeitos sistêmicos marcantes, nos acidentes causados pelas serpentes *Crotalus durissus terrificus* não são observados sinais inflamatórios significativos no local da picada (Amorim *et al.*, 1951; Rosenfeld, 1971), diferente do que é observado em acidentes causados por outros gêneros de serpentes, entre eles, o gênero *Bothrops*. (Rosenfeld, 1971; Gutierrez & Lomonte, 1989).



Fig 2. Efeitos sistêmicos (A,B e C) e ausência de efeitos locais (D e E) decorrentes do envenenamento por serpentes *Crotalus durissus terrificus*.

1.1 Inflamação: considerações gerais

As primeiras informações relacionadas à inflamação remontam à antiguidade. Em escritos da Mesopotâmia e do Antigo Egito já eram encontrados termos relacionados ao processo inflamatório. Celsius, no século I, foi quem fez as primeiras descrições lógicas do fenômeno inflamatório, além de enumerar os quatro sinais clássicos da inflamação: calor, rubor, tumor e dor. Um quinto sinal clínico, a perda de função, foi posteriormente acrescentado, no século XIX por Virchow (Majno & Joris, 2004).

No século XIX, com o desenvolvimento da microscopia óptica, Julius Cohnhein realizou as primeiras observações microscópicas do processo inflamatório, enfocando as alterações vasculares e suas conseqüências, tais como o extravasamento plasmático e a migração celular para o foco inflamatório (Lewis, 1986). Contudo, somente no final do século XIX, aparece a teoria de Metchnikoff que atribuía às células fagocitárias um papel de destaque na resposta inflamatória (Cotran *et al.*, 1999).

Todas as teorias desenvolvidas, com base nesses quatro sinais descritos por Celsius, constituíram o principal caminho para o conhecimento do processo inflamatório (Majno & Joris, 2004).

Adicionalmente a essas teorias, Thomas Lewis, no século XX, estabeleceu o conceito de que determinadas substâncias químicas eram responsáveis pela mediação das alterações vasculares que ocorrem durante o processo inflamatório como, por exemplo, a histamina (Cotran *et al.*, 1999; Majno & Joris, 2004).

A inflamação por definição é uma resposta complexa do tecido conjuntivo vascularizado frente a uma determinada injúria, que ocorre de maneira estereotipada, independente da natureza do estímulo lesivo. Essa resposta compreende eventos vasculares, celulares e linfáticos (Albeda & Buck, 1990; Carlos & Harlan, 1990; Osborn, 1990), cuja finalidade é a eliminação do agente lesivo, o restabelecimento da funcionalidade tecidual e a manutenção da homeostasia do organismo (Cotran *et al.*, 1999; Rankin, 2004).

1.1.1. Eventos vasculares

Os eventos vasculares da resposta inflamatória compreendem alterações hemodinâmicas, que culminam no extravasamento de proteínas plasmáticas para o tecido adjacente. Inicialmente ocorre uma vasoconstrição transitória seguida de uma vasodilatação que favorece o aumento do fluxo sanguíneo, causando calor e vermelhidão no local da injúria. Essas alterações são seguidas por mudanças estruturais na parede do vaso caracterizadas principalmente pela contração das células endoteliais e abertura de junções entre essas células. Essas alterações levam ao aumento da permeabilidade vascular e conseqüente extravasamento de proteínas plasmáticas para o tecido intersticial (Kowal-Vern *et al.*, 1997; Rankin, 2004), o qual caracteriza o edema inflamatório (Janeway & Travers, 1994; Tedgui & Mallat, 2001). O extravasamento de proteínas para o tecido intersticial causa ainda o aumento da viscosidade do sangue e a redução do fluxo sanguíneo. Essas alterações hemodinâmicas levam à estase sanguínea e conseqüente alteração da orientação das células sanguíneas, isto é, estas células que antes se localizavam na região central do vaso, passam para a

periferia deste. Esta alteração propicia o contato dos leucócitos com as células endoteliais, fenômeno este denominado de marginação leucocitária (Cotran *et al.*, 1999).

1.1.2. Eventos celulares

Na periferia do vaso a interação dos leucócitos com as células endoteliais ocorre em diferentes fases. Inicialmente os leucócitos rolam sobre o endotélio e em seguida aderem-se firmemente à superfície vascular. Posteriormente, migram em direção ao foco inflamatório. Esses eventos denominados respectivamente de *rolling*, adesão e migração de leucócitos envolvem a expressão de uma grande variedade de moléculas de adesão, entre elas, as selectinas, as integrinas e seus ligantes (Springer, 1995; Rankin, 2004).

A interação entre as diferentes moléculas de adesão e seus respectivos ligantes permite que os eventos de *rolling*, adesão e migração leucocitária ocorram de forma dinâmica no decorrer do processo inflamatório. Resumidamente, as moléculas de adesão podem ser encontradas na forma solúvel como proteínas circulantes ou ligadas à superfície das células. Entretanto, a expressão dessas moléculas depende do tipo celular (Rankin, 2004).

As selectinas são expressas na superfície de leucócitos, plaquetas e células endoteliais e são as principais responsáveis pelo *rolling* dos leucócitos ao longo da periferia (Butcher, 1991). A P-selectina, a principal selectina, é constitutivamente expressa em plaquetas ativadas e em células endoteliais. A E-selectina é expressa no endotélio ativado por citocinas inflamatórias, enquanto

que a L-selectina, é encontrada na maioria dos leucócitos (Bevilaqua *et al.*, 1989; Bevilaqua, 1995) (Mayadas *et al.*, 1993; Ley *et al.*, 1995; Rankin, 2004).

As integrinas, uma outra família de moléculas de adesão, são expressas pelos leucócitos e são compostas por duas subunidades α e β . Estas subunidades possuem um longo domínio extracelular que se liga às proteínas da matriz extracelular ou aos seus ligantes específicos, presentes nas células. Entre as integrinas, podemos citar as pertencentes à subfamília das β_2 integrinas, tais como a VLA-4, expressa em neutrófilos, cujo ligante é a VCAM-1, encontrada na superfície das células endoteliais. Essa ligação entre VLA-4 e VCAM-1 é responsável pela adesão de neutrófilos ao endotélio vascular e pelo recrutamento de leucócitos para o foco inflamatório. A VCAM-1 participa da adesão de linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos à superfície endotelial (Dansky *et al.*, 2000).

Imediatamente após a adesão ao endotélio, os leucócitos emitem pseudópodes entre as junções das células endoteliais, atravessam a membrana basal e finalmente migram para o espaço extravascular, em direção ao foco da lesão (Oda *et al.*, 1995). A migração direcionada dos leucócitos é um processo denominado quimiotaxia. Esse fenômeno envolve a interação dos agentes quimiotáticos com seus receptores específicos, presentes na membrana dos leucócitos. Essa ligação leva a ativação da fosfolipase C que hidrolisa o fosfatidilinositol-4-5-bisfosfato (PIP_2) em inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3) e diacilglicerol (DAG), com conseqüente ativação da proteína quinase C e aumento de cálcio intracelular, resultando na movimentação celular (Cotran *et al.*, 1999).

O exsudato celular é caracterizado na fase inicial inflamatória pela presença predominante de neutrófilos e, posteriormente, pela predominância de células mononucleares (Cotran *et al.*, 1999; Majno & Joris, 2004). Uma vez no sítio inflamatório, essas células iniciam o processo de fagocitose do agente lesivo e dos debrís celulares (Auger & Ross, 1992). O sucesso desse evento determina a resolução da lesão.

O macrófago é a principal célula efetora do sistema mononuclear fagocitário. Esta célula tem grande atividade secretória que inclui mais de cem substâncias biologicamente ativas, tais como proteínas plasmáticas e substâncias que modulam a função e crescimento de outras células (citocinas, colagenases, ativador do plasminogênio, prostaglandinas, componentes do sistema complemento entre outras) (Takemura & Werb, 1984; Nathan, 1987; Rappolee & Werb, 1988). A secreção destas substâncias determina a multifuncionalidade dos macrófagos e a sua participação em diversos processos fisiológicos e fisiopatológicos: hematopoese, hemostasia, inflamação, resposta imune, cicatrização, controle do desenvolvimento tumoral, destruição de microorganismos e outros (Tapper, 1996)

Cabe ressaltar que os eventos vasculares e celulares da resposta inflamatória, descritos acima de forma seqüencial, acontecem simultaneamente durante essa resposta.

1.1.3. Mediadores químicos da inflamação

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. Esses mediadores podem ser 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, serotonina, metabólitos do ácido araquidônico, fator de ativação plaquetário (PAF), óxido nítrico (NO) e interleucinas (Cotran *et al.*, 1999; Rankin, 2004; Majno & Joris, 2004).

Particularmente, os metabólitos do ácido araquidônico são gerados após um estímulo lesivo por ação da enzima fosfolipase A₂, a qual degrada os fosfolípidos de membrana celular, gerando o ácido araquidônico (Crowley, 1996). Este, por sua vez, é degradado pela ação das enzimas ciclooxigenases (COX-1 e COX-2) e lipoxigenases. As prostaglandinas, as prostaciclina e os tromboxanos são os metabólitos gerados pela via das ciclooxigenases enquanto que os leucotrienos e as lipoxinas são gerados pela via das lipoxigenases (Cotran *et al.*, 1999; Rankin, 2004). A ciclooxigenase-1 (COX-1) é uma enzima constitutiva, expressa em vários tecidos, envolvida na sinalização de células e na homeostasia tecidual (Majno & Joris, 2004).

Já a ciclooxigenase-2 (COX-2), é uma enzima induzível a partir de um estímulo inflamatório.

Em relação à atuação desses metabólitos na resposta inflamatória, as prostaglandinas e as prostaciclina causam vasodilatação e potencializam a formação de edema inflamatório (Cotran *et al.*, 1999; Majno & Joris, 2004); os

leucotrienos causam vasoconstricção, aumento da permeabilidade vascular e atuam ainda como agentes quimiotáticos (Lewis *et al.*, 1990; Roitt *et al.*, 1999). Adicionalmente, as lipoxinas, mediadores endógenos gerados pela via das lipoxigenases, possuem atividade antiinflamatória. A lipoxina A₄ inibe a migração de neutrófilos, a liberação de interleucina-1 β (IL-1 β) por essas células (Moncada, 1992) e ainda estimula a fagocitose de neutrófilos apoptóticos por macrófagos (Godson *et al.*, 2001). As lipoxinas A₄ e B₄ são geradas pela ação das enzimas 12-lipoxigenase de plaquetas ou da 15-lipoxigenase de macrófagos sobre o leucotrieno A₄ liberado pelos neutrófilos (Levy *et al.*, 1993; Serhan & Sheppard, 1990; Bonnans *et al.*, 2002).

Ainda nos eventos vasculares deve ser destacada a participação dos seguintes mediadores: os fragmentos C3a e C5a do sistema complemento; os fibrinopeptídeos, oriundos da degradação da fibrina; a bradicinina, proveniente do sistema das cininas, aminas vasoativas (serotonina e histamina) (Majno & Palade, 1961), além do fator de ativação plaquetária (PAF). Um outro mediador importante é o óxido nítrico (NO). Esse mediador é um potente agente vasodilatador sintetizado por células endoteliais e macrófagos, pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) sobre a L-arginina e o oxigênio. Existem três isoformas descritas: neuronal (nNOS ou tipo I), induzível (iNOS ou tipo II) e a endotelial (eNOS ou tipo III). A nNOS e a eNOS são enzimas constitutivas, enquanto que a iNOS são expressas em processos inflamatórios e imunes, induzidos por lipopolissacarídeos bacterianos e citocinas (Moncada *et al.*, 1991; Alderton *et al.*, 2001).

Em relação aos eventos celulares, podemos destacar as ações como agentes quimiotáticos dos seguintes mediadores: fragmento C5a do

complemento (entre outras funções, induz o aumento da expressão de integrinas pelos leucócitos), fibrinopeptídeos, leucotrieno B₄, IL-8 e o fator de ativação plaquetária (PAF) (atua também no processo de agregação e adesão de leucócitos ao endotélio) (Cotran *et al.*, 1999; Rankin *et al.*, 2004).

Cabe enfatizar que, os mediadores químicos, acima descritos, atuam de uma maneira inter-relacionada, nos eventos vasculares e celulares da resposta inflamatória (Rocha e Silva & Garcia-Leme, 1972; Ferreira & Vane, 1973; Majo & Joris, 2004).

1.1.4. Resolução da resposta inflamatória

De um modo geral, a resposta inflamatória aguda pode apresentar quatro diferentes tipos de finalização: a resolução completa, a substituição de tecido por fibrose, a formação de abscesso ou a progressão dessa resposta para uma inflamação crônica.

A resolução completa da resposta inflamatória está estritamente relacionada a uma lesão limitada, de baixa destruição tecidual e ainda ao tipo do agente lesivo. Essa resolução envolve a neutralização dos mediadores químicos e conseqüente interrupção do extravasamento plasmático e da infiltração leucocitária. Essa interrupção, para a completa resolução do processo, deve ser seguida pela remoção do edema, leucócitos e debris celulares pelo tecido linfático e fagócitos. Entretanto, a persistência do agente ou a ampla destruição tecidual impede a resolução da inflamação, o que determina a cronificação deste processo (Cotran *et al.*, 1999; Rankin, 2004).

1.2 A carragenina como agente flogístico

A carragenina é um polissacarídeo sulfatado proveniente de um musgo marinho da Irlanda, denominado *Chondrus crispus* (Van Arman, 1979). Modelos utilizando este agente inflamatório vêm sendo amplamente utilizados tanto para a investigação da fisiopatologia da inflamação aguda (Di Rosa, 1972; Vinegar *et al.*, 1982), como também para a triagem de drogas antiinflamatórias (Winter *et al.*, 1962). Normalmente, a inflamação induzida pela injeção de carragenina nas cavidades pleural e peritoneal é 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).

Levy (1969), um dos primeiros autores a investigar a evolução do edema de pata induzido pela carragenina, descreveu que a injeção deste agente, na pata posterior de camundongos, causa um edema similar ao desenvolvido no rato, apresentando o mesmo tempo de duração (uma fase), porém de menor intensidade. Entretanto, posteriormente, Henriques e colaboradores (1987) demonstraram pela primeira vez que a injeção de carragenina no tecido subcutâneo da pata de camundongos induzia um edema bifásico. A primeira fase se caracterizava por um edema de baixa intensidade com pico em 6 horas e a segunda fase por um edema mais pronunciado, o qual se iniciava 24 h após a injeção de carragenina, atingia um pico em 72 h e declinava após 96 h.

Esse estudo tornou-se referência, uma vez que o modelo de edema de pata induzido pela carragenina em camundongos tem sido amplamente utilizado

para a caracterização de novas substâncias pró-inflamatórias ou antiinflamatórias, bem como nos estudos sobre a fisiopatologia da inflamação (Di Rosa *et al.*, 1971; Vinegar *et al.*, 1973, Posadas *et al.*, 2004).

Por outro lado, Ianaro e colaboradores (1994) demonstraram que a carragenina provoca apenas a segunda fase do desenvolvimento do edema, em camundongos da linhagem BALB/c.

Recentemente, Posadas e colaboradores (2004) demonstraram que em camundongos Swiss o edema de pata induzido por carragenina é dependente da idade e do peso dos animais, sendo que 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, mais intenso, difere do primeiro pelo aumento da expressão de COX-2, a qual começa a ser detectada a partir da 24^a hora e permanece até a 72^a hora após a injeção da carragenina.

Em relação ao componente celular da resposta inflamatória, Vinegar e colaboradores (1973) demonstraram por meio de análise histológica que a injeção intraplantar de carragenina determina a infiltração de neutrófilos no tecido subcutâneo da pata de ratos. Em relação à cinética de migração dos neutrófilos, os mesmos autores observaram que aos 20 minutos estas células estavam localizadas nos 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 h após a injeção da carragenina. Nesse mesmo período, começava a ser observada a presença de alguns monócitos.

Em relação à mediação da resposta celular inflamatória induzida pela carragenina, Wallace e colaboradores (1999) demonstraram através do modelo

da bolsa de ar em ratos que a migração celular é mediada principalmente pela COX-1. Outros estudos referem também a participação de citocinas pró-inflamatórias na migração celular induzida pela carragenina, uma vez que foram detectados altos níveis de TNF- α , IL-1 α e IL-1 β após a injeção de carragenina (Utsunomiya *et al.*, 1991; Cuzzocrea *et al.*, 1999).

1.3 Drogas antiinflamatórias utilizadas em estudos experimentais

De maneira ideal, uma substância para ser classificada como antiinflamatória deve ser capaz de reverter as manifestações clínicas decorrentes da resposta inflamatória, ou seja, a dor, o rubor, o calor e o tumor. Entretanto, o termo antiinflamatório é amplo e pode ser aplicado a drogas ou a substâncias que inibem um dos eventos inflamatórios induzidos experimentalmente (Van Arman, 1979; Rang *et al.*, 1997; Singla & Singh, 2000).

A literatura relata a utilização de drogas antiinflamatórias nos estudos experimentais que caracterizam a ação de novas substâncias pró e antiinflamatórias (Filho *et al.*, 2004; Montanher *et al.*, 2007).

Levando em conta, a existência de um grande número de drogas antiinflamatórias, nesta introdução serão abordadas resumidamente, apenas as ações das drogas utilizadas no presente estudo.

A dexametasona é um antiinflamatório esteroide que induz o aumento da síntese de lipocortina-1, uma proteína que inibe a expressão da fosfolipase A₂ e a conseqüente expressão dos mediadores derivados do metabolismo do ácido araquidônico, tanto os gerados pela via da ciclooxigenase, como os

gerados pela via da lipoxigenase, tais como as prostaglandinas e os leucotrienos, respectivamente (Barnes & Adcock, 1993; de Faria *et al.*, 2001; Becker *et al.*, 2004).

A indometacina é uma droga antiinflamatória não esteroideal que inibe as enzimas ciclooxigenases (COX-1 e COX-2) impedindo dessa forma a síntese de prostanóides e tromboxanos (Van Arman, 1979; Rang *et al.*, 1997; El Desoky, 2001).

O nimesulide é um outro antiinflamatório que vem se destacando entre o uso das drogas não esteroideais. Swigle e colaboradores (1976) demonstraram a atividade antiinflamatória deste agente através de métodos convencionais, tais como o edema de pata induzido pela carragenina e artrite induzida por adjuvante de Freud. Trata-se de um potente inibidor específico da ciclooxigenase-2, que impede conseqüentemente a síntese de prostaglandinas. Além disso, a ação desta droga não está somente focada para a inibição da síntese de prostanóides, pois o nimesulide também atua sobre as funções de neutrófilos e nas suas interações com o endotélio e na síntese de PAF (Singla & Singh, 2000).

O L-N^G-nitro arginine methyl ester (L-NAME) é uma droga antiinflamatória não seletiva que inibe a síntese de óxido nítrico (NO) pelas enzimas óxido nítrico sintetases (eNOS, iNOS, nNOS) impedindo dessa forma, a ação do NO sobre os eventos da resposta inflamatória (Iuvone *et al.*, 1997; Dal Secco *et al.*, 2004).

1.4. Efeitos 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 edema discreto sem lesões teciduais marcantes (Amorim *et al.*, 1951). De fato, experimentalmente foi observado 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 por histamina (Sousa-e-Silva *et al.*, 1996).

Além da fraca atividade flogística do VCdt, várias linhas de evidências demonstram o papel modulador deste veneno sobre a resposta inflamatória. Landucci e colaboradores (1995, 2000) mostraram que a crotapotina, componente CA da ctx inibe o edema de pata de ratos induzido por carragenina ou por fosfolipases A₂ isoladas de venenos animais.

Sousa-e-Silva *et al.* (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 espriamento e a capacidade de fagocitose de macrófagos peritoneais de camundongos, as quais são células relevantes no processo inflamatório.

Em continuidade a esse estudo, Sampaio *et al.* (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 observado tanto estimulação do “burst” respiratório (geração de peróxido de oxigênio), da geração de óxido nítrico, da atividade fungicida e do metabolismo de glicose e glutamina, quanto a inibição do espraiamento e da atividade fagocítica dessas células. Recentemente, foi demonstrado que a ctx, particularmente a fosfolipase A₂, o componente B desta toxina, é a responsável pela ação inibitória do veneno sobre as funções dos macrófagos (Sampaio *et al.*, 2003; 2005). Estudos recentes evidenciaram que os metabólitos do ácido araquidônico, derivados da via da lipoxigenase, estão envolvidos neste efeito (Sampaio *et al.*, 2006). Ainda dentro dessa linha de pesquisa, estudos realizados pelo nosso grupo demonstram também, que o VCdt inibe a secreção de citocinas IL- α e IL-1 β por macrófagos estimulados pelo processo de fagocitose ou por lipopolissacarídeos (LPS) (Cury *et al.*, 2006).

As evidências apresentadas acima sobre o efeito inibitório do VCdt e de seus componentes sobre algumas funções dos macrófagos, claramente demonstram o papel modulador desse veneno sobre a inflamação. No entanto, até o momento não foi investigado se o veneno bruto ou sua principal toxina, a ctx apresenta um efeito antiinflamatório sobre os eventos vasculares e celulares da resposta inflamatória. A relevância dessa investigação motivou esse estudo.

*

*

*

Apesar das evidências demonstradas na Introdução, os estudos caracterizando o efeito antiinflamatório do veneno e de seus componentes, sobre os eventos da resposta inflamatória aguda induzida por um agente inflamatório, são ainda escassos ou inexistentes. Dessa forma, dando continuidade aos estudos que vêm sendo desenvolvidos pelo nosso grupo nessa linha de pesquisa, o presente estudo visa avaliar o possível efeito antiinflamatório do VCdt e da ctx, principal componente desse veneno, sobre o processo inflamatório agudo. A caracterização desta ação pode vir a determinar o uso deste veneno, bem como suas frações como agentes terapêuticos ou como ferramentas científicas importantes para a compreensão do controle da resposta inflamatória.

2- Objetivo

O presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos do pré e pós-tratamento com o VCdt e da ctx, principal componente tóxico deste veneno, sobre os seguintes eventos da resposta inflamatória aguda, induzida pela administração da carragenina em camundongos:

- a) desenvolvimento do edema de pata
- b) migração de células para a cavidade peritoneal
- c) interação leucócito-endotélio na microcirculação do músculo cremaster

3. Material e Métodos

3.1 Animais

Foram utilizados para a realização deste estudo, camundongos Swiss, machos, pesando entre 18-22g, 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 176/2004 e 268/2006).

3.2. Veneno

Foi utilizado um *pool* de veneno liofilizado extraído de espécimes adultos de serpentes *Crotalus durissus terrificus*, fornecido pelo Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan. O *pool* de veneno foi estocado a – 20°C e no momento do uso foi diluído em solução salina estéril.

3.3 Crotoxina

A fração crotoxina do VCdt foi gentilmente fornecida pela Dra. Sandra Coccuzzo Sampaio, pesquisadora do Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan.

3.3.1. Isolamento e purificação da ctx

O isolamento e a purificação da ctx do VCdt foram realizados no Laboratório de Imunopatologia do Instituto Butantan.

A purificação da ctx foi realizada segundo o método descrito por Faure & Bon (1987), modificado. Uma alíquota contendo 15 mg do veneno foi ressuspensa em 1ml de Tris-HCl (50 mM, pH 7,0) e centrifugada a 10,000 g por 10 minutos (Ultra-Centrífuga Eppendorf) para a remoção do material insolúvel. O sobrenadante obtido foi submetido à cromatografia de troca aniônica em uma coluna MONO-Q HR 5/5 de 5 ml, em sistema FPLC (Fast-Performance Liquid Chromatography, Pharmacia), em tampão Tris/HCl 50 mM, pH 7,0 (tampão de equilíbrio) para o isolamento da ctx. As proteínas adsorvidas à resina foram eluídas por um gradiente linear de 0 a 1 M NaCl, tamponado com o tampão de equilíbrio. Foram obtidos 3 picos principais (Picos I, II e III), sendo o Pico II correspondente à eluição da crotoxina. Frações de 1 ml foram coletadas e a eluição foi acompanhada pela leitura da absorbância a 280 nm. As frações contendo a crotoxina foram testadas quanto à homogeneidade e pureza por eletroforese em gel de poliacrilamida (Laemmli, 1970). Os tubos correspondentes à crotoxina foram reunidos e dialisados e a sua concentração foi determinada pelo método de Bradford (1976).

3.4 Planejamento geral

Durante o desenvolvimento deste estudo, foi investigado o efeito do VCdt sobre a resposta inflamatória induzida por carragenina. Para tanto, foram

avaliados os efeitos dos tratamentos com o VCdt sobre os seguintes parâmetros: (a) desenvolvimento do edema de pata (b) migração de células para a cavidade peritoneal e (c) interação leucócito-endotélio na microcirculação do músculo cremaster.

3.5 Protocolo experimental

3.5.1 Tratamento com o VCdt

Os animais foram pré ou pós-tratados com uma única dose de VCdt de 75 µg/kg em 50µL de salina estéril, pela via subcutânea, ou na dose de 440 µg/kg em 200µL de salina estéril pela via oral. Os grupos controles foram constituídos por animais tratados com os mesmos volumes de salina nas mesmas condições experimentais. O pré-tratamento foi realizado 1h, 7, 14 ou 21 dias antes da injeção de carragenina (15 mg/kg) e o pós-tratamento 1, 4 ou 48 h após a injeção da carragenina.

As concentrações de veneno total utilizadas no presente estudo foram baseadas em trabalhos anteriores (Sousa-e-Silva *et al.*, 1996).

Cabe ressaltar que a dose administrada de VCdt não causou os sinais clínicos característicos de envenenamento crotálico nos animais, tais como ptose palpebral, fâcies miastênica e mioglobinúria (Rosenfeld, 1971; Ministério da Saúde, 1998).

3.5.2. Tratamento com a ctx:

Uma única dose de 44 µg/kg de ctx (0.89 µg em 50µL) foi administrada pela via subcutânea. O pré-tratamento foi realizado 1 h antes da injeção de carragenina. Os grupos controles foram constituídos por animais tratados com os mesmos volumes de salina nas mesmas condições experimentais. O pós-tratamento foi realizado 1 hora após a injeção de carragenina, sendo que o grupo controle recebeu o mesmo volume de salina também nas mesmas condições experimentais.

3.5.3. Tratamentos farmacológicos

Para comparar o efeito do VCdt com outras drogas antiinflamatórias, os animais foram tratados com as seguintes drogas: dexametasona (inibidor de FLA₂, Ache, Brasil), na dose de 1 mg/kg s.c. (de Faria *et al.*, 2001); indometacina (inibidor de síntese de prostaglandinas, Sigma, USA), na dose de 3 mg/kg s.c. (Gonçalves & Mariano, 2000; Pinheiro & Calixto, 2002); L-N^G-nitro arginine methyl ester (L-NAME) (inibidor da síntese de óxido nítrico, Sigma, USA) 100 mg/kg s.c., (Tan-No *et al.*, 2006) ou nimesulide (inibidor de COX-2, Ache, USA) na dose de 100 mg/kg via oral (Wallace *et al.*, 1999; Süleyman *et al.*, 2004). Essas drogas foram administradas sozinhas ou associadas ao VCdt, 1 h após a injeção de carragenina. Os grupos controles foram constituídos por animais tratados com os mesmos volumes de salina nas mesmas condições experimentais.

3.6. Efeito do VCdt sobre a resposta inflamatória induzida por carragenina

3.6.1. Desenvolvimento de edema de pata induzido por carragenina

O edema de pata foi induzido pela injeção de 50 µL de carragenina (15 mg/kg) no tecido subcutâneo do coxim plantar da pata posterior direita dos camundongos. Como controle, a pata contralateral foi injetada com 50µL de salina. O aumento da espessura da pata foi determinado com o auxílio de um paquímetro, antes (0h) e 2, 4, 6, 24, 48, 72 e 96 h após a injeção da carragenina. Para cada tempo avaliado, o edema foi expresso em porcentagem de aumento da espessura da pata, calculada pela fórmula:

$$E\% = \frac{EF - EI}{EI} \times 100, \text{ onde:}$$

E% = aumento porcentual da espessura da pata

EI = espessura inicial da pata

EF = espessura da pata após os animais receberem os tratamentos.

O resultado final foi obtido pela diferença entre o edema da pata injetada com carragenina e o edema da pata controle, injetada com salina.

3.6.2. Migração celular para a cavidade peritoneal induzida por carragenina.

A migração de células para a cavidade peritoneal foi induzida pela injeção intraperitoneal de 200 μ L de carragenina (15 mg/kg) antes ou após o tratamento com o VCdt como detalhado no protocolo experimental (item 3.5.1.). Os animais do grupo controle foram tratados com o mesmo volume de salina (200 μ L), nas mesmas condições experimentais. Após 4 h da injeção de carragenina, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂, e a cavidade peritoneal foi lavada com 5mL de tampão fosfato salina, pH 7,4 (PBS). Após a massagem do abdômen, o exsudato peritoneal foi coletado e as contagens total e diferencial das células realizadas.

3.6.2.1. Contagem total e diferencial de células peritoneais.

A suspensão de células peritoneais foi diluída na proporção 1/2 (v:v) com líquido de Thoma e a contagem total 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 óptica de luz, utilizando-se objetiva de imersão.

3.6.3 Interação leucócito-endotélio na microcirculação do músculo cremaster

Para avaliar o efeito do veneno crotálico sobre a interação leucócito-endotélio da microcirculação do músculo cremaster, os animais foram tratados com VCdt (75 µg/Kg), 1 h antes ou após da injeção de 100 µL de carragenina (15 mg/kg) no subcutâneo da bolsa escrotal. Após 2 h da injeção de carragenina, os animais foram anestesiados com xilazina e cloridrato de quetamina (10mg/kg, via s.c.) e com auxílio de uma tesoura de ponta fina foi realizada a exposição do músculo cremaster e a secção do epidídimo para o desprendimento do músculo cremaster. Após este procedimento, a preparação foi mantida aquecida em uma placa com temperatura controlada (37°C), dotada de uma área transparente, através da qual o leito microvascular do músculo cremaster pôde ser visualizado (Baez *et al.*, 1973). Na microcirculação deste músculo, foi selecionada, aleatoriamente, uma vênula pós-capilar com comprimento de 100 µm e diâmetro entre 20 e 40 µm. Em cada segmento selecionado foram avaliados os fenômenos de “*rolling*” e adesão dos leucócitos ao endotélio, contados por um período de 1 minuto. A migração das células para o tecido conjuntivo adjacente foi determinada pela contagem dos leucócitos presentes em até 50 µm de distância de cada lado do segmento analisado. Esta análise foi realizada em microscópio de luz (Zeiss Axioskop), acoplado a uma câmera para captação das imagens (JVC TK-C600), em objetiva de 10x. As imagens foram transmitidas para um aparelho de televisão ligado a um vídeo cassete, e a um computador provido de um programa de análise de imagens (Kontron, KS 300).

3.7 Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como média \pm S.E.M. Para análise estatística do edema de pata foi realizado o teste ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Tukey. A migração celular e a interação leucócito-endotélio foram analisadas estatisticamente pelo ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey. As análises estatísticas foram determinadas com o programa GraphPad Prism software (versão 4.0). Diferenças com $p < 0.05$ foram consideradas estatisticamente significativas.

4. Resultados

4.1. Desenvolvimento do edema de pata induzido por carragenina

A injeção de 300 µg (50 µL) de carragenina, no tecido subcutâneo do coxim plantar de camundongos, induziu um edema que apresentou duas fases. A primeira fase inicia-se imediatamente após a injeção da carragenina, aumenta progressivamente, atinge o primeiro pico na 6^a hora e decai na 24^a hora. A segunda fase inicia-se após 24 h e atinge um pico mais intenso que o primeiro na 72^a hora. Após esse tempo, o edema decai progressivamente, atingindo valores próximos ao da pata contralateral injetada com salina, 96 horas após a injeção da carragenina (Fig. 4).

4.1.1. Efeito do pré-tratamento com o VCdt sobre o desenvolvimento do edema de pata induzido por carragenina

Os resultados mostraram que o tratamento com o VCdt, 7 dias ou 1 h antes da injeção de carragenina, reduziu significativamente o desenvolvimento do edema de pata induzido pela carragenina, quando comparado aos animais tratados com salina (Fig. 4 e 5). Essa redução foi observada em todos os tempos em que o edema foi avaliado, porém mostrou-se mais intensa no tempo de 72 h. Neste tempo, o decréscimo do edema nos animais tratados com o VCdt em relação ao edema dos animais controles, tratados com salina, foi de 48% (VCdt+cg: $16,2 \pm 2,9$; salina+cg: $30,6 \pm 2,2$; $p < 0,05$) para o pré-tratamento de 7 dias (Fig.4) e de 55% para o pré tratamento de 1 h (VCdt+cg: $15,6 \pm 1,6$;

salina+cg: $34,0 \pm 1,1$; $p < 0,05$) (Fig. 5). Entretanto, não foi observada diferença estatística significativa entre esses dois tempos de pré-tratamento em todos os tempos avaliados. Em relação ao tratamento com o VCdt 14 dias antes da injeção da carragenina, não foi observada diferença no desenvolvimento do edema em todos os tempos avaliados, quando comparado ao grupo controle tratado com salina (Fig. 3).

4.1.2. Efeito do pós-tratamento com o VCdt sobre o desenvolvimento do edema de pata induzido por carragenina

Em relação aos animais tratados com o VCdt 1 h após a injeção de carragenina, foi observado um decréscimo do edema em todos os tempos avaliados. Para o segundo pico de edema (pico mais intenso), esse decréscimo foi de 24% (VCdt+cg: $32,1 \pm 1,4$; cg+salina: $42,2 \pm 1,2$; $p < 0,05$) quando comparados aos animais tratados com salina (Fig. 6).

Com a finalidade de investigar o efeito do tratamento com o VCdt, após um tempo maior da instalação da resposta inflamatória, o VCdt foi administrado 4 ou 48 h após a injeção de carragenina, antes do primeiro e do segundo picos de edema, respectivamente. Nos animais tratados com o VCdt 4h após a injeção de carragenina, foi observada uma redução de 33% no primeiro pico (6 h) (cg+VCdt: $19,90 \pm 0,95$; cg+salina: $29,78 \pm 2,64$; $p < 0,05$) e de 40% (cg+VCdt: $22,8 \pm 0,5$; cg+salina: $38,1 \pm 0,3$; $p < 0,05$) na formação do segundo pico do edema (72 h), quando comparados aos animais tratados com salina (Fig. 7A). Quando os animais foram tratados com o VCdt 48 h após a injeção de carragenina, não foi observado o segundo pico de edema (72h) (Fig. 7B).

4.1.3. Efeito dos tratamentos com VCdt, dexametasona, indometacina, L-NAME ou nimesulide sobre o desenvolvimento do edema de pata induzido por carragenina

Com a finalidade de comparar o efeito do VCdt com o de outras drogas antiinflamatórias sobre o edema de pata induzido pela carragenina, os animais foram tratados 1 h após a injeção de carragenina com o VCdt, dexametasona, indometacina, L-NAME ou nimesulide. Após os tratamentos, o desenvolvimento do edema foi avaliado nos tempos de 6 h (1º pico) e 72 h (2º pico) após a injeção da carragenina.

Como mostra a Figura 8, no primeiro pico de edema, o VCdt, a dexametasona, a indometacina, o L-NAME e o nimesulide, reduziram o edema em 48%, 42%, 41%, 52% e 46% respectivamente, quando comparados ao grupo tratado com salina. Em relação ao segundo pico de edema, somente o VCdt e o nimesulide reduziram o edema em 35% e 45% respectivamente, quando comparados ao grupo controle tratado com salina.

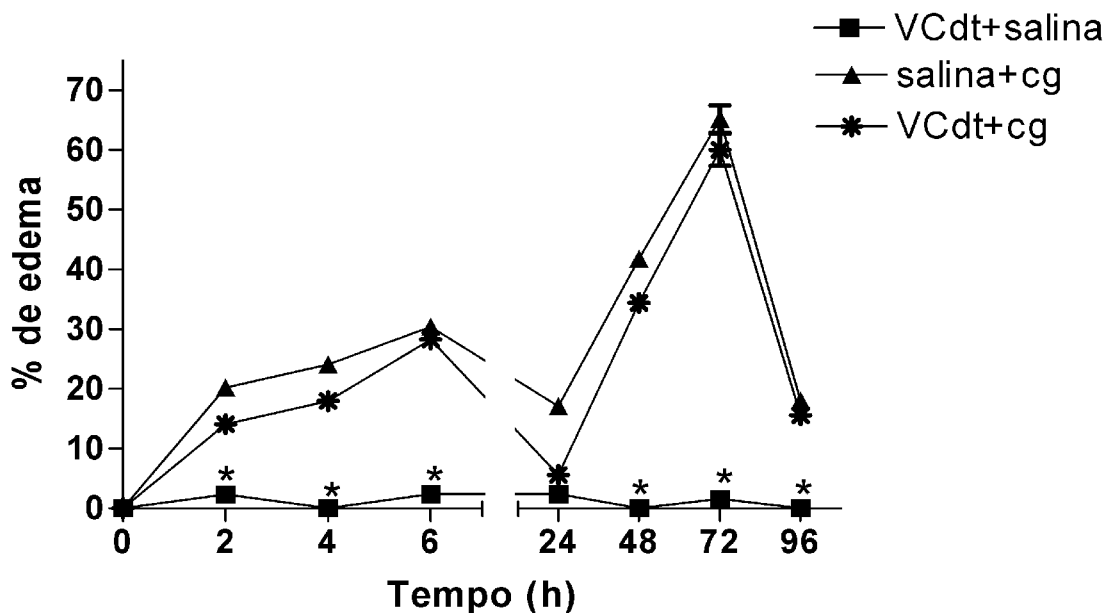


Figura 3. Efeito do pré-tratamento com o VCdt sobre o edema de pata induzido por carragenina (14 dias). Os animais foram tratados com o VCdt (1,5 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ s.c.) ou salina 14 dias antes da injeção intraplantar de carragenina (cg) (300 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$) ou salina. As espessuras das patas foram avaliadas em diferentes intervalos de tempo, usando um paquímetro. Os resultados foram calculados pela diferença de espessura de ambas as patas e o edema calculado pelo aumento da espessura da pata em porcentagem. Os resultados foram expressos como média \pm S.E.M (n=5 a 10 animais por grupo). *p < 0,05 estatisticamente diferente do grupo tratado com salina (salina+cg).

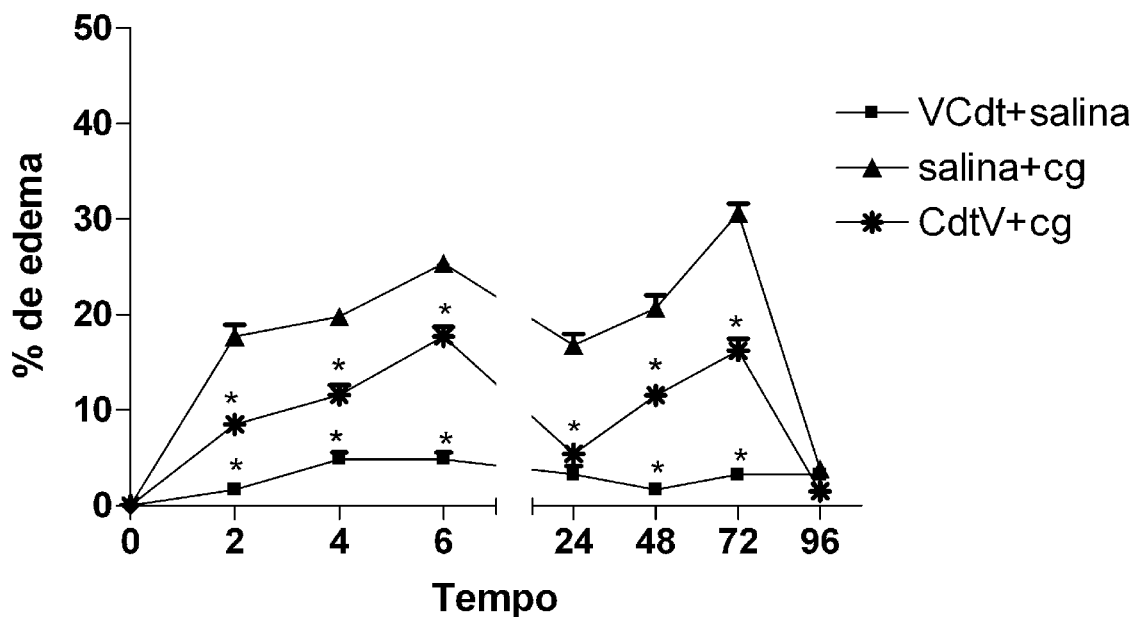


Figura 4. Efeito do pré-tratamento com o VCdt sobre o edema de pata induzido por carragenina (7 dias). Os animais foram tratados com o VCdt (1,5 µg/50 µL s.c.) ou salina 07 dias antes da injeção intraplantar de carragenina (cg) (300 µg/ 50µL) ou salina. As espessuras das patas foram avaliadas em diferentes intervalos de tempo, usando um paquímetro. Os resultados foram calculados pela diferença de espessura de ambas as patas e o edema calculado pelo aumento da espessura da pata em porcentagem. Os resultados foram expressos como média ± S.E.M (n=5 a 10 animais por grupo). *p< 0,05 estatisticamente diferente do grupo tratado com salina (salina+cg).

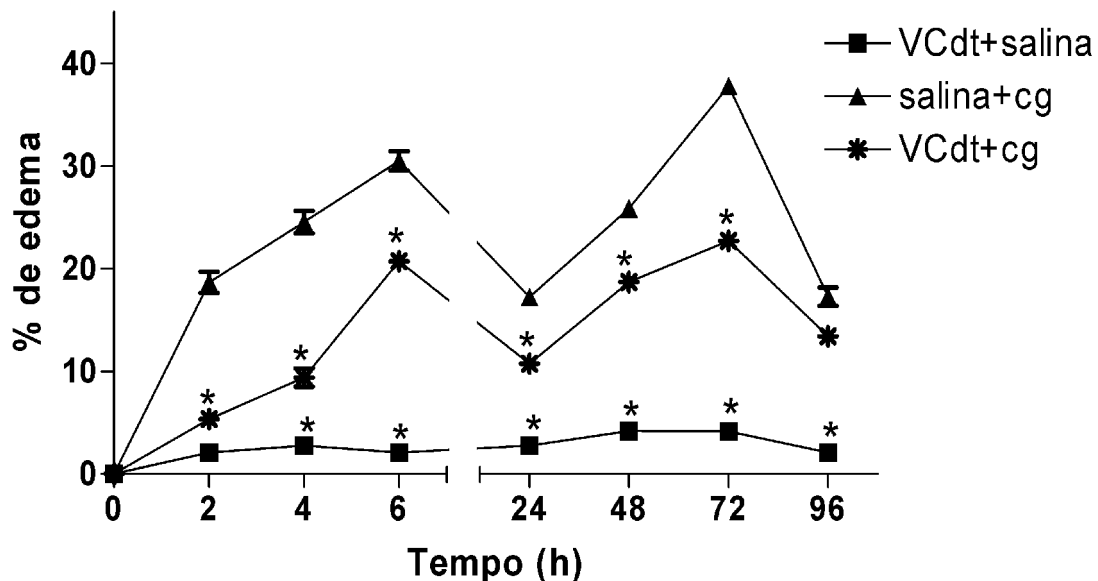


Figura 5. Efeito do pré-tratamento com o VCdt sobre o edema de pata induzido por carragenina (1 h). Os animais foram tratados com o VCdt (1,5 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ s.c.) ou salina 1 h antes da injeção intraplantar de carragenina (cg) (300 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$) ou salina. As espessuras das patas foram avaliadas em diferentes intervalos de tempo, usando um paquímetro. Os resultados foram calculados pela diferença de espessura de ambas as patas e o edema calculado pelo aumento da espessura da pata em porcentagem. Os resultados foram expressos como média \pm S.E.M (n=5 a 10 animais por grupo). *p< 0,05 estatisticamente diferente do grupo tratado com salina (salina+cg).

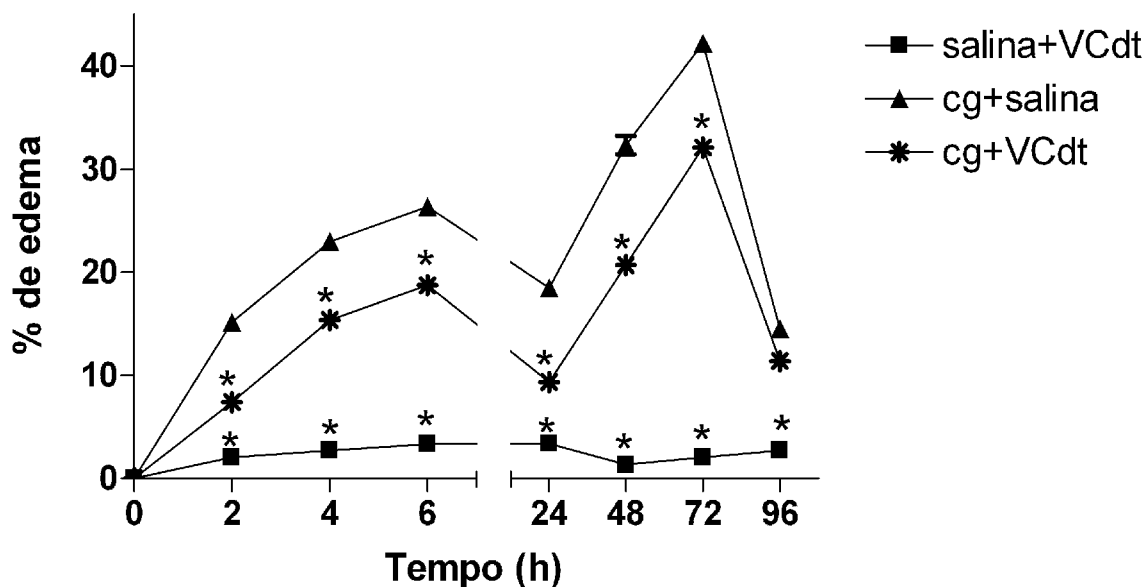


Figura 6. Efeito do pós-tratamento com o VCdt sobre o edema de pata induzido por carragenina (1 h). Os animais foram tratados com o VCdt (1,5 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ s.c.) ou salina 1 h após a injeção intraplantar de carragenina (cg) (300 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$) ou salina. As espessuras das patas foram avaliadas em diferentes intervalos de tempo, usando um paquímetro. Os resultados foram calculados pela diferença de espessura de ambas as patas e o edema calculado pelo aumento da espessura da pata em porcentagem. Os resultados foram expressos como média \pm S.E.M (n=5 a 10 animais por grupo). * $p < 0,05$ estatisticamente diferente do grupo tratado com salina (cg+salina).

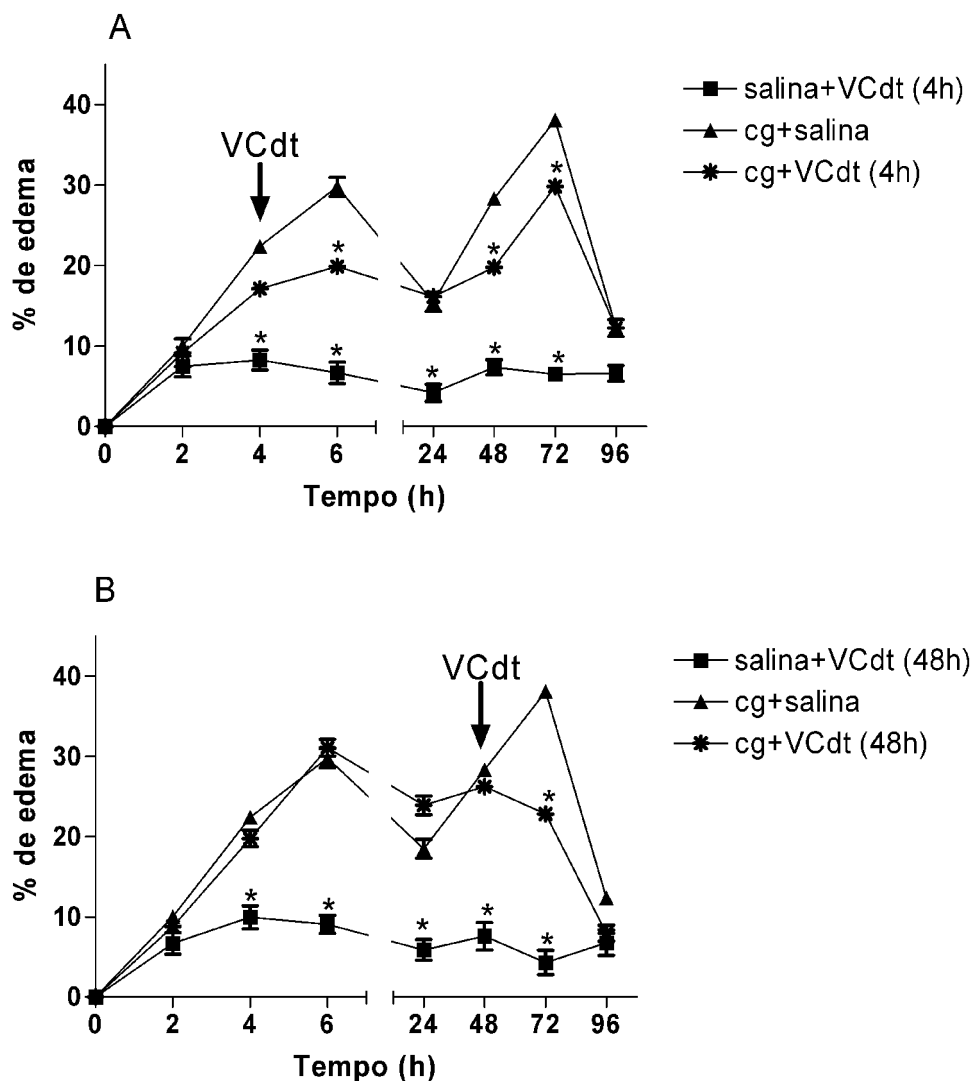


Figura 7. Efeito do pós-tratamento com o VCdt sobre o edema de pata induzido por carragenina. Os animais foram tratados com o VCdt (1,5 µg/50 µL s.c.) ou salina 4 h (A) ou 48 h (B) após a injeção intraplantar de carragenina (cg) (300 µg/50 µL) ou salina. As espessuras das patas foram avaliadas em diferentes intervalos de tempo, usando um paquímetro. Os resultados foram calculados pela diferença de espessura de ambas as patas e o edema calculado pelo aumento da espessura da pata em porcentagem. Os resultados foram expressos como média ± S.E.M (n= 5 a 10 animais por grupo). *p< 0,05 estatisticamente diferente do grupo tratado com salina (cg+salina). Seta: tempo do tratamento com o VCdt.

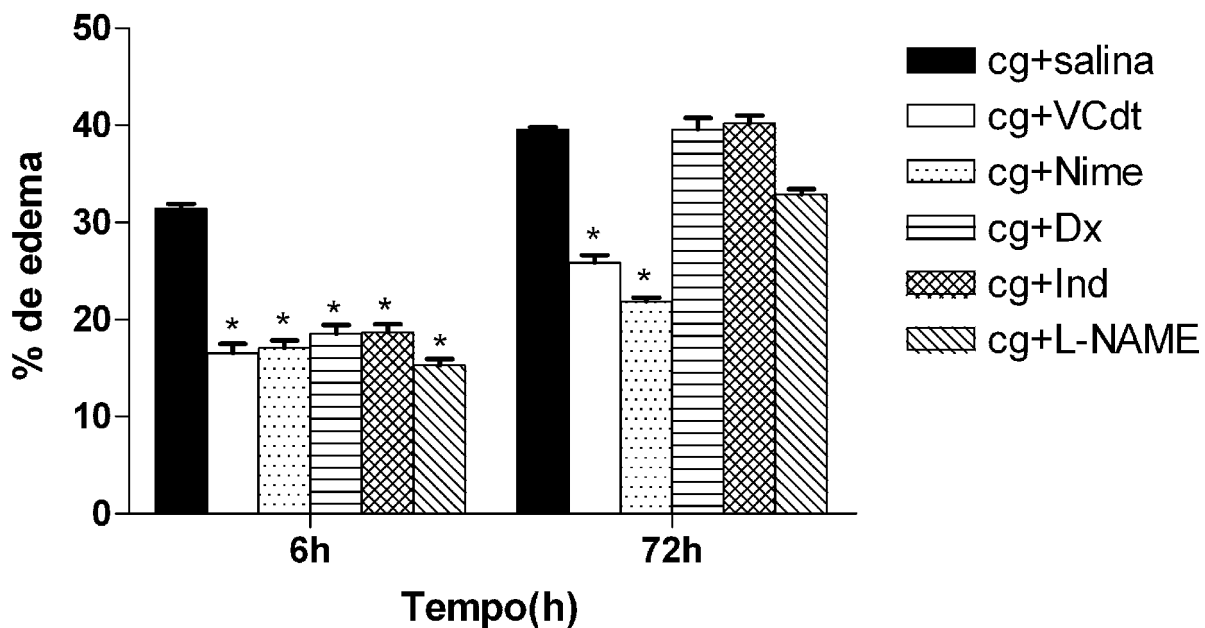


Figura 8. Efeito do tratamento com o VCdt e outras drogas antiinflamatórias sobre o edema de pata induzido por carragenina. Após 1 h da injeção intraplantar de carragenina (cg) (300 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$) ou salina, os animais foram tratados com o VCdt (1,5 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ s.c.) ou salina ou dexametasona (Dx) (4 mg/kg) ou indometacina (Ind) (4 mg/kg s.c.) ou nimesulide (Nime) (30 mg/kg v.o.) ou L-NAME (100 mg/kg s.c.). As espessuras das patas foram avaliadas nos tempos de 6 e 72 h, usando um paquímetro. Os resultados foram calculados pela diferença de espessura de ambas as patas e o edema calculado pelo aumento da espessura da pata em porcentagem. Os resultados foram expressos como média \pm S.E.M (n= 5 a 10 animais por grupo). *P< 0,05 estatisticamente diferente do grupo tratado com salina (cg+salina).

4.2. Migração celular para a cavidade peritoneal induzida por carragenina

Quatro horas após a injeção intraperitoneal de carragenina (300µg/50µL) foi observado um aumento da contagem de células peritoneais totais, resultante do aumento de polimorfonucleares, quando comparado aos animais injetados (i.p.) com salina (Tabela 1).

4.2.1. Efeito do pré-tratamento com o VCdt, administrado pela via subcutânea, sobre a migração celular induzida por carragenina

A Tabela 1 mostra que os animais tratados com o VCdt pela via subcutânea 21, 14, 7 dias ou 1 h antes da injeção de carragenina apresentaram uma redução significativa no número de células totais que migraram para a cavidade peritoneal quando comparados aos animais tratados com salina. Essa redução foi de 60%, 38%, 55% e 40%, para o pré-tratamento de 21, 14, 7 dias ou 1 h, respectivamente. Em relação à contagem diferencial, foi observado um decréscimo no número de polimorfonucleares em todos os tempos de pré-tratamento. Da mesma forma, foi observado um decréscimo de 69% no número de mononucleares nos animais tratados com o VCdt 21 dias antes da injeção da carragenina.

4.2.2. Efeito do pós-tratamento com o VCdt, administrado pela via subcutânea, sobre a migração celular induzida por carragenina

Os animais tratados com o VCdt 1 h após a injeção de carragenina apresentaram um número de células peritoneais significativamente menor quando comparados aos animais tratados com salina, sendo que essa redução foi de 43%. Os resultados mostraram ainda que o mesmo tratamento reduziu em 30% e 68% o número de mononucleares e polimorfonucleares, respectivamente (Tabela 1).

4.2.3. Efeito dos tratamentos com VCdt, dexametasona, indometacina, L-NAME ou nimesulide, administrados pela via subcutânea sobre a migração celular induzida por carragenina

Com a finalidade de comparar o efeito do tratamento com VCdt com o de outras drogas antiinflamatórias, sobre a migração celular induzida pela carragenina, os animais foram tratados com o VCdt, dexametasona, indometacina, L-NAME ou nimesulide, 1 h após a injeção de carragenina.

A Tabela 2 mostra que o tratamento com o VCdt, assim como os tratamentos com a dexametasona, a indometacina e o nimesulide, 1 h após a injeção intraperitoneal de carragenina, reduziram os números totais de células peritoneais. Essa redução foi de 40% para os tratamentos com VCdt, dexametasona ou indometacina e de 48% para o tratamento com nimesulide.

Em relação à contagem diferencial, a redução no número de polimorfonucleares foi de 65% para os tratamentos com o VCdt ou a

indometacina e de 77% e 80% para os tratamentos com o nimesulide ou a dexametasona, respectivamente (Tabela 2).

A tabela 2 mostra ainda que, quando o VCdt foi administrado em associação com a dexametasona, a indometacina ou o nimesulide, 1 h após a injeção intraperitoneal de carragenina, não foram observadas diferenças significativas no número de células totais migradas para a cavidade peritoneal quando comparado aos animais tratados com o VCdt e as drogas isoladamente.

4.2.4. Efeito do pré-tratamento com VCdt, administrado pela via oral sobre a migração celular induzida por carragenina

Para investigar se a via de administração do VCdt seria importante para sua ação inibitória, o VCdt foi administrado pela via oral e o efeito do tratamento foi avaliado sobre o modelo da migração celular, um dos parâmetros avaliados neste estudo.

A Tabela 3 mostra que os animais tratados com o VCdt pela via oral 14, 7 dias ou 1 h antes da injeção de carragenina apresentaram uma redução significativa no número de células totais que migraram para a cavidade peritoneal quando comparados aos animais tratados com salina. Essa redução foi de 43%, 38% e 45%, para o pré-tratamento de 14, 7 dias ou 1 h respectivamente. Em relação à contagem diferencial, foi observado um decréscimo no número de células polimorfonucleares em todos os tempos de pré-tratamento, sendo que esse decréscimo foi de 62%, 60% e 80% para os

tratamentos de 14, 7 dias e 1 h, respectivamente, antes da injeção intraperitoneal de carragenina, comparados ao tratamento com salina.

4.2.5. Efeito do pós-tratamento com VCdt, administrado pela via oral sobre a migração celular induzida por carragenina

Em relação ao tratamento com o VCdt, 1 h após a injeção de carragenina, foi observado no exsudato peritoneal um decréscimo estatisticamente significativo no número de células peritoneais que migraram quando comparado ao grupo controle tratado com salina. Os resultados mostraram ainda que o mesmo tratamento reduziu o número de polimorfonucleares, presentes no exsudato. A redução foi de 25% para o número total de células peritoneais e de 65% para o número de polimorfonucleares, como observado na contagem diferencial (Tabela 3).

Tabela 1. Contagens total e diferencial de células presentes no exsudato peritoneal coletado 4 h após a injeção intraperitoneal de carragenina (cg) (300 µg/200 µL) ou salina.(sal). Os animais foram tratados com o VCdt (s.c. 1,5 µg/50 µL) ou salina 21, 14, 7 dias ou 1h antes da injeção intraperitoneal de carragenina ou salina, ou tratados 1 h após a injeção de carragenina ou salina(i.p.). Os resultados foram expressos como média ± S.E.M. *p< 0,05, estatisticamente diferente do grupo controle (sal+cg para o pré-tratamento ou cg+sal para o pós-tratamento)

Tabela 1. Efeito do pré e do pós-tratamento com VCdt, administrado pela via subcutânea, sobre a migração celular induzida por carragenina.

Tempo	Grupo	N° total de células (x 10 ⁶ /mL)	N° de mono* (x 10 ⁶ /mL)	N° de poli** (x 10 ⁶ /mL)
21 dias antes	sal+sal	0,85 ± 0,12*	0,59 ± 0,02*	0,26 ± 0,07*
	sal+cg	2,25 ± 0,12	1,23 ± 0,14	1,02 ± 0,14
	VCdt+sal	0,82 ± 0,08*	0,57 ± 0,11*	0,25 ± 0,07*
	VCdt+cg	0,92 ± 0,07*	0,60 ± 0,07*	0,32 ± 0,06*
14 dias antes	sal+sal	1,19 ± 0,11*	0,84 ± 0,06	0,35 ± 0,07*
	sal+cg	2,51 ± 0,21	1,19 ± 0,07	1,32 ± 0,26*
	VCdt+sal	1,21 ± 0,11*	1,00 ± 0,09	0,21 ± 0,05
	VCdt+cg	1,56 ± 0,10*	1,11 ± 0,08	0,45 ± 0,09*
7 dias antes	sal+sal	0,85 ± 0,12*	0,66 ± 0,11	0,19 ± 0,03*
	sal+cg	1,99 ± 0,12	0,97 ± 0,14	1,02 ± 0,14
	VCdt+sal	0,82 ± 0,07*	0,55 ± 0,11	0,27 ± 0,07*
	VCdt+cg	0,92 ± 0,07*	0,60 ± 0,07	0,32 ± 0,06*
1 h antes	sal+sal	1,20 ± 0,09*	1,15 ± 0,08	0,05 ± 0,02*
	sal+cg	2,30 ± 0,21	1,25 ± 0,13	1,05 ± 0,11
	VCdt+sal	1,41 ± 0,06*	1,35 ± 0,10	0,06 ± 0,03*
	VCdt+cg	1,37 ± 0,09*	1,29 ± 0,08	0,08 ± 0,02*
1 h depois	sal+sal	1,06 ± 0,08*	0,94 ± 0,09	0,10 ± 0,03*
	Cg+sal	1,88 ± 0,04	1,24 ± 0,10	0,64 ± 0,06
	sal+VCdt	1,07 ± 0,09*	0,95 ± 0,03	0,12 ± 0,07*
	cg+ VCdt	1,08 ± 0,09*	0,88 ± 0,06*	0,20 ± 0,04*

*mono= Número de mononucleares (x 10⁶ células/mL)

**poli= Número de polimorfonucleares (x 10⁶ células/mL)

Tabela 2. Contagens total e diferencial de células presentes no exsudato peritoneal coletado 4 h após a injeção intraperitoneal de carragenina (cg) (300 µg/200 µL) ou salina (sal). Os animais foram tratados pela via subcutânea com o VCdt (1,5 µg/50 µL) ou com drogas antiinflamatórias específicas, como: dexametasona (Dx) (1 mg/kg, s.c.), indometacina (Ind) (4 mg/kg, s.c.), L-N^G-nitro arginine methyl ester (L-NAME) (100 mg/kg, s.c.) ou nimesulide (Nime) (100 mg/kg p.o.) 1 h após a injeção intraperitoneal de carragenina (300 µg/200 µL) ou salina. O grupo controle recebeu o tratamento pela via subcutânea com salina nas mesmas condições experimentais. Os resultados foram expressos como média ± S.E.M. (n=5 por grupo). *p< 0,05, estatisticamente diferente do grupo tratado com salina (cg+sal).

Tabela 2. Efeito do VCdt e de outras drogas antiinflamatórias sobre a migração celular induzida por carragenina.

Tratamento	Grupo	N° total de células (x 10 ⁶ /mL)	N° de mono* (x10 ⁶ /mL)	N° de poli** (x 10 ⁶ /mL)
Dx	cg + sal	1,34 ± 0,24	0,32 ± 0,03	1,02 ± 0,14
	sal+Dx	0,65 ± 0,10*	0,46 ± 0,03	0,19 ± 0,05
	cg+Dx	0,77 ± 0,07*	0,57 ± 0,05	0,20 ± 0,03*
	cg+Dx+VCdt	0,66 ± 0,04*	0,43 ± 0,03	0,23 ± 0,02*
Ind	cg + sal	1,34 ± 0,24	0,32 ± 0,03	1,02 ± 0,14
	sal+Ind	0,62 ± 0,06*	0,45 ± 0,03	0,17 ± 0,02
	cg+Ind	0,84 ± 0,08*	0,45 ± 0,06	0,39 ± 0,12*
	cg+Ind+VCdt	0,70 ± 0,9*	0,46 ± 0,03	0,24 ± 0,04*
Nime	Cg+ sal	1,34 ± 0,24	0,32 ± 0,03	1,02 ± 0,14
	sal+Nime	0,61 ± 0,03*	0,36 ± 0,02	0,25 ± 0,01
	cg+Nime	0,70 ± 0,05*	0,47 ± 0,03	0,23 ± 0,05*
	cg+Nime+VCdt	0,82 ± 0,02*	0,52 ± 0,03	0,30 ± 0,05*
VCdt	cg+sal	1,34 ± 0,24	0,32 ± 0,03	1,02 ± 0,14
	sal+vcdt	0,72 ± 0,18*	0,40 ± 0,04	0,32 ± 0,04*
	cg+vcdt	0,82 ± 0,19*	0,47 ± 0,02	0,35 ± 0,02*

*mono= Número de mononucleares (x 10⁶ células/mL)

**poli= Número de polimorfonucleares (x 10⁶ células/mL)

Tabela 3. Contagens total e diferencial de células presentes no exsudato peritoneal coletado 4 h após a injeção intraperitoneal de carragenina (cg) (300 µg/200 µL) ou salina (sal). Os animais foram tratados com o VCdt pela via oral (8,8 µg/200 µL) ou salina 14, 7 dias ou 1 h antes da injeção intraperitoneal de carragenina ou salina, ou tratados 1 h após a injeção intraperitoneal de carragenina ou salina. Os resultados foram expressos como média ± S.E.M. *p<0,05, estatisticamente diferente do grupo tratado com salina (sal+cg para o pré-tratamento ou cg+sal para o pós-tratamento).

Tabela 3. Efeito do pré e do pós-tratamento com VCdt administrado pela via oral sobre a migração celular induzida por carragenina.

Tempo	Grupo	N° total de células (x 10 ⁶ /mL)	N° de mono* (x 10 ⁶ /mL)	N° de poli** (x 10 ⁶ /mL)
14 dias Antes	sal+sal	0,62 ± 0,06*	0,52 ± 0,08*	0,20 ± 0,01*
	sal+cg	1,61 ± 0,17	1,02 ± 0,18	0,59 ± 0,06
	VCdt+sal	0,71 ± 0,03*	0,56 ± 0,06*	0,15 ± 0,03*
	VCdt+cg	0,92 ± 0,12*	0,69 ± 0,25	0,23 ± 0,07*
7 dias Antes	sal+sal	0,67 ± 0,07*	0,40 ± 0,05	0,27 ± 0,02*
	sal+cg	1,16 ± 0,30	0,62 ± 0,17	0,54 ± 0,14
	VCdt+sal	0,65 ± 0,04*	0,39 ± 0,03	0,26 ± 0,01*
	VCdt+cg	0,73 ± 0,05*	0,51 ± 0,04	0,22 ± 0,02*
1 h antes	sal+sal	0,63 ± 0,06*	0,40 ± 0,06*	0,23 ± 0,03*
	sal+cg	1,09 ± 0,05	0,62 ± 0,17	0,47 ± 0,03
	VCdt+sal	0,66 ± 0,02*	0,39 ± 0,03*	0,27 ± 0,01*
	VCdt+cg	0,60 ± 0,06*	0,51 ± 0,04	0,09 ± 0,02*
1 h depois	sal+sal	0,62 ± 0,05*	0,48 ± 0,08	0,14 ± 0,07*
	Cg+sal	1,05 ± 0,06	0,28 ± 0,03	0,77 ± 0,16
	Sal+VCdt	0,58 ± 0,02*	0,37 ± 0,03	0,21 ± 0,02*
	cg+VCdt	0,78 ± 0,02*	0,51 ± 0,04*	0,27 ± 0,03*

*mono= Número de mononucleares (x 10⁶ células/mL)

**poli= Número de polimorfonucleares (x 10⁶ células/mL)

4.3. Interação leucócito-endotélio na microcirculação do músculo cremaster de camundongos, avaliada por microscopia intravital

Com a finalidade de avaliar o efeito do VCdt sobre a interação leucócito-endotélio na microcirculação do músculo cremaster, foram avaliados os eventos celulares de *rolling*, adesão e migração celular, por meio da microscopia intravital. Duas horas após a administração de carragenina (Fig. 11) no tecido subcutâneo da bolsa escrotal dos animais, foram observados uma diminuição do número de células em estado de *rolling* e um aumento do número de células aderidas ao endotélio e de células que migraram para o tecido conjuntivo adjacente, quando comparados à injeção de salina no subcutâneo da bolsa escrotal dos animais (Fig. 10).

4.3.1. Efeito do pré-tratamento com o VCdt sobre a interação leucócito-endotélio na microcirculação do músculo cremaster de camundongos

A Figura 9 mostra que os animais tratados com o VCdt, pela via subcutânea, 1 h antes da injeção intraescrotal de carragenina apresentaram na segunda hora após a injeção de carragenina no tecido subcutâneo da bolsa escrotal um aumento de 371% no número de células em estado de *rolling* (VCdt+cg: $26,4 \pm 0,74$; salina+cg: $5,6 \pm 0,50$; $p < 0,05$). Neste mesmo período foi observado um decréscimo de 90% do número de células aderidas ao endotélio (VCdt+cg: $1,16 \pm 0,50$; salina+cg: $11,3 \pm 0,89$; $p < 0,05$) e de 72% no número de células que migraram para o tecido extravascular (VCdt+cg: $0,5 \pm$

0,48; salina+cg: $1,8 \pm 0,37$; $p < 0,05$), quando comparado aos animais tratados com salina (Fig. 12).

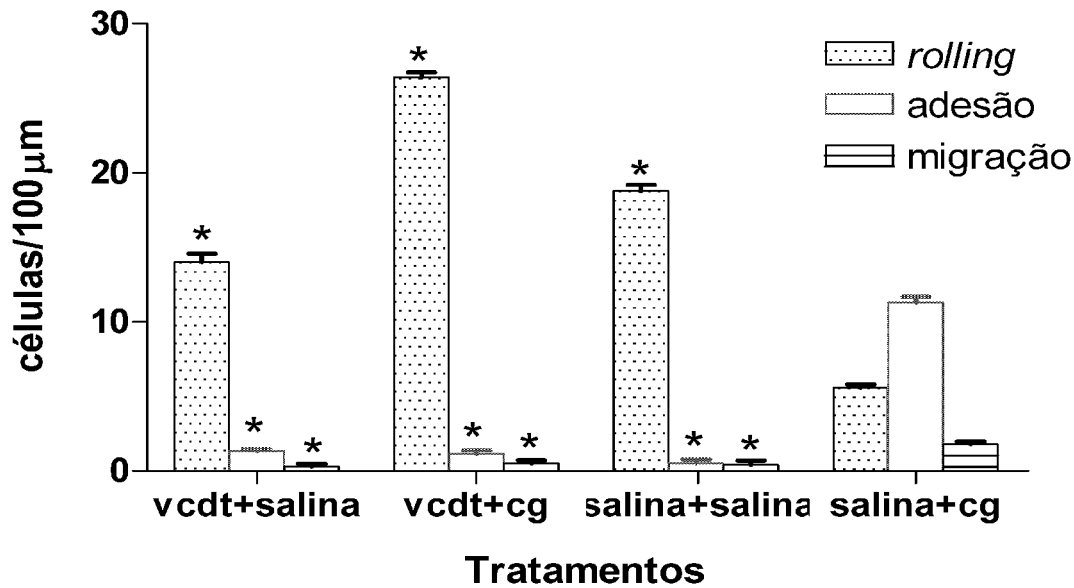


Figura 9. Efeito do pré-tratamento com o VCdt sobre a interação leucócito-endotélio, induzida por carragenina, na microcirculação do músculo cremaster. Avaliação dos leucócitos em *rolling*, aderidos e migrados. Os animais receberam o tratamento com o VCdt (1,5 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ s.c.) ou salina, 1h antes da injeção de carragenina (cg) (300 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$) ou salina no subcutâneo da bolsa escrotal. Após 2 h, o cremaster foi exposto e sua microcirculação foi avaliada por microscopia intravital. Uma vênula pós-capilar (diâmetro de 20-40 μm) foi selecionada e observada em cada animal. Os leucócitos em *rolling* foram contados durante um período de 1 min após a exposição da microcirculação. Os leucócitos aderidos foram contados ao longo de 100 μm do vaso e os leucócitos emigrados avaliados pela contagem das células presentes a uma distância de até 50 μm de cada lado do mesmo segmento vascular. Os resultados foram expressos como média \pm S.E.M (n= 5 a 10 animais por grupo). *p< 0,05 estatisticamente diferente do grupo tratado com salina (salina+cg).

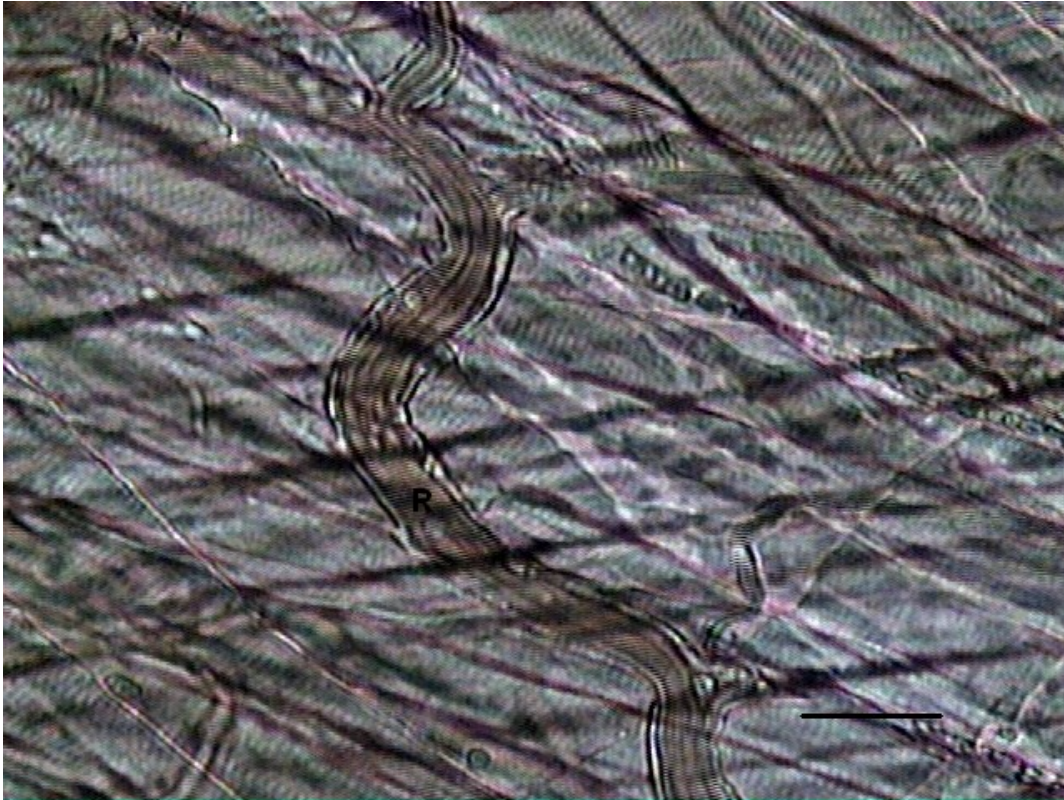


Figura 10. Efeito da injeção de salina sobre a interação leucócito-endotélio da microcirculação do músculo cremaster de camundongos. Os animais receberam a injeção de salina (100 μL) no subcutâneo da bolsa escrotal. Após 2 h, o cremaster foi exposto e sua microcirculação foi avaliada por microscopia intravital. Uma vênula pós-capilar (diâmetro de 20-40μm) foi selecionada e observada em cada animal. Os leucócitos em *rolling* foram contados durante um período de 1 min, 10 min após a exposição da microcirculação. Os leucócitos aderidos foram contados ao longo de 100 μm do vaso e os leucócitos emigrados avaliados pela contagem das células presentes em uma distância de até 50 μm de cada lado do mesmo segmento vascular. Barra: 40μm. R: células em estado de *rolling*.

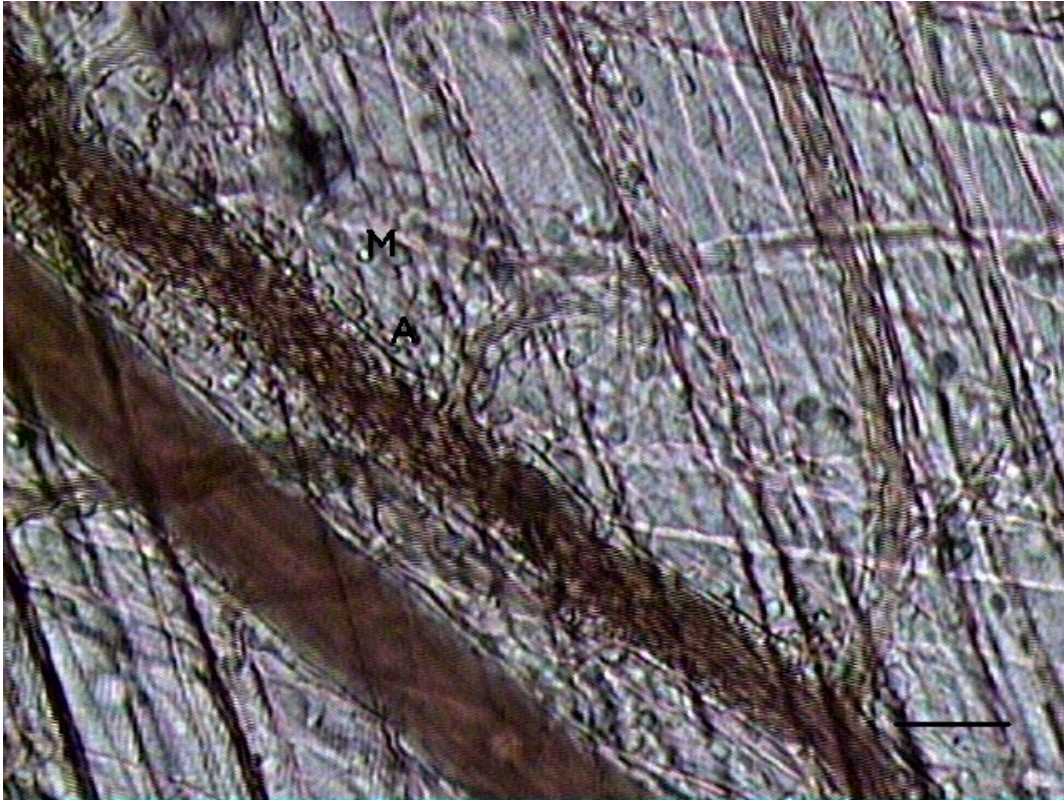


Figura 11. Efeito da injeção de carragenina sobre a interação leucócito-endotélio na microcirculação do músculo cremaster de camundongos. A carragenina (cg) (300 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$) foi injetada no subcutâneo da bolsa escrotal dos animais. Após 2 h, o cremaster foi exposto e sua microcirculação foi avaliada por microscopia intravital. Uma vênula pós-capilar (diâmetro de 20-40 μm) foi selecionada e observada em cada animal. Os leucócitos em *rolling* foram contados durante um período de 1 min, após a exposição da microcirculação. Os leucócitos aderidos foram contados ao longo de 100 μm do vaso e os leucócitos emigrados avaliados pela contagem das células presentes em uma distância de até 50 μm de cada lado do mesmo segmento vascular. Barra: 40 μm . A: células aderidas ao endotélio. M: células migradas.

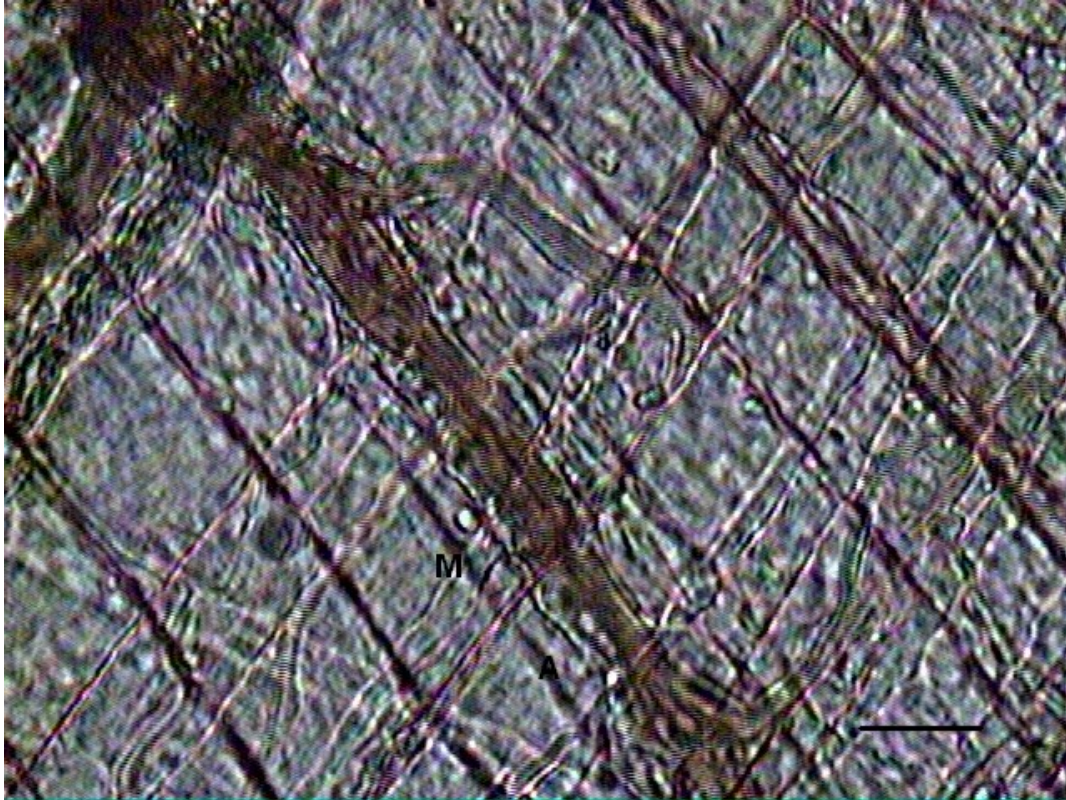


Figura 12. Efeito do pré-tratamento com o VCdt sobre a interação leucócito-endotélio, induzida por carragenina, na microcirculação do músculo cremaster de camundongos. Após 1 h da injeção subcutânea de VCdt (1,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$), os animais receberam a injeção de carragenina (cg) (300 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$) no subcutâneo da bolsa escrotal. Após 2 h, o cremaster foi exposto e sua microcirculação foi avaliada por microscopia intravital. Uma vênula pós-capilar (diâmetro de 20-40 μm) foi selecionada e observada em cada animal. Os leucócitos em *rolling* foram contados durante um período de 1 min, após a exposição da microcirculação. Os leucócitos aderidos foram contados ao longo dos 100 μm do vaso e os leucócitos emigrados avaliados pela contagem das células presentes em uma distância de até 50 μm de cada lado do mesmo segmento vascular. Barra: 40 μm . A: células aderidas ao endotélio. M: células migradas.

4.3.2. Efeito do pós-tratamento com o VCdt sobre a interação leucócito-endotélio na microcirculação do músculo cremaster de camundongos

Em relação ao tratamento com o VCdt 1 h após a injeção de carragenina no tecido subcutâneo da bolsa escrotal, foi observado, 2 h após a injeção de carragenina no subcutâneo da bolsa escrotal dos animais, um aumento de 90% no número de células em estado de *rolling* (cg+VCdt: $8,4 \pm 0,74$; cg+salina: $4,4 \pm 0,50$; $p < 0,05$). Ainda neste período houve um decréscimo de 54% (cg+VCdt: $4,6 \pm 0,50$; cg+salina: $10 \pm 0,89$; $p < 0,05$) e de 31% (cg+VCdt: $2,2 \pm 0,48$; cg+salina: $3,2 \pm 0,37$; $p < 0,05$) no número de células aderidas e migradas respectivamente, quando comparado ao grupo tratado com salina (cg+salina) (Figuras 13 e 14).

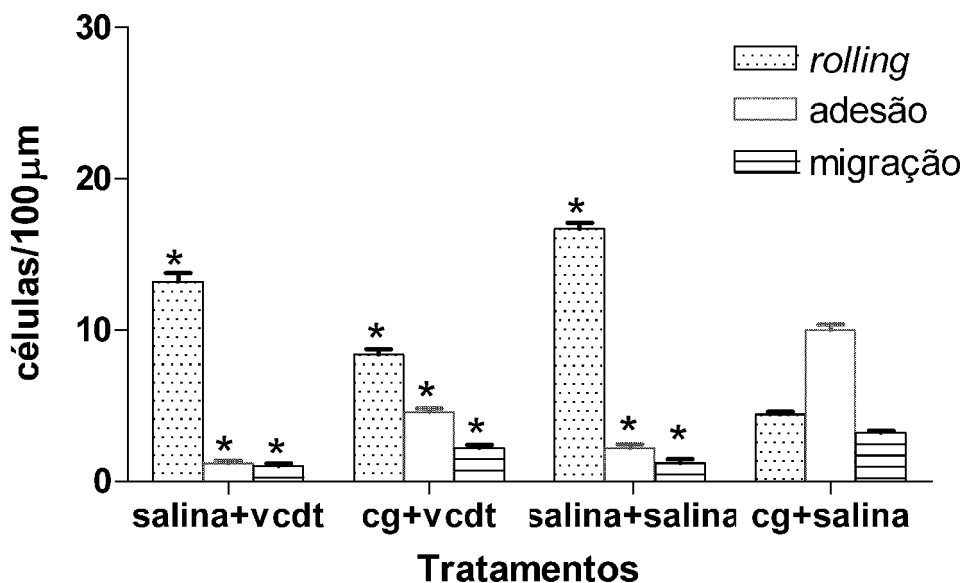


Figura 13. Efeito do pós-tratamento com o VCdt sobre a interação leucócito-endotélio na microcirculação do músculo cremaster induzida por carragenina. Avaliação dos leucócitos em *rolling*, aderidos e migrados. Os animais receberam o tratamento com o VCdt (1,5 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ s.c.) ou salina, 1h após a injeção de carragenina (cg) (300 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$) ou salina no subcutâneo da bolsa escrotal. Após 2 h, o cremaster foi exposto e sua microcirculação foi avaliada por microscopia intravital. Uma vênula pós-capilar (diâmetro de 20-40 μm) foi selecionada e observada em cada animal. Os leucócitos em *rolling* foram contados durante um período de 1 min após a exposição da microcirculação. Os leucócitos aderidos foram contados ao longo de 100 μm do vaso e os leucócitos emigrados avaliados pela contagem das células presentes a uma distância de até 50 μm de cada lado do mesmo segmento vascular. Os resultados foram expressos como média \pm S.E.M (n= 5 a 10 animais por grupo). *p< 0,05 estatisticamente diferente do grupo tratado com salina (salina+cg).

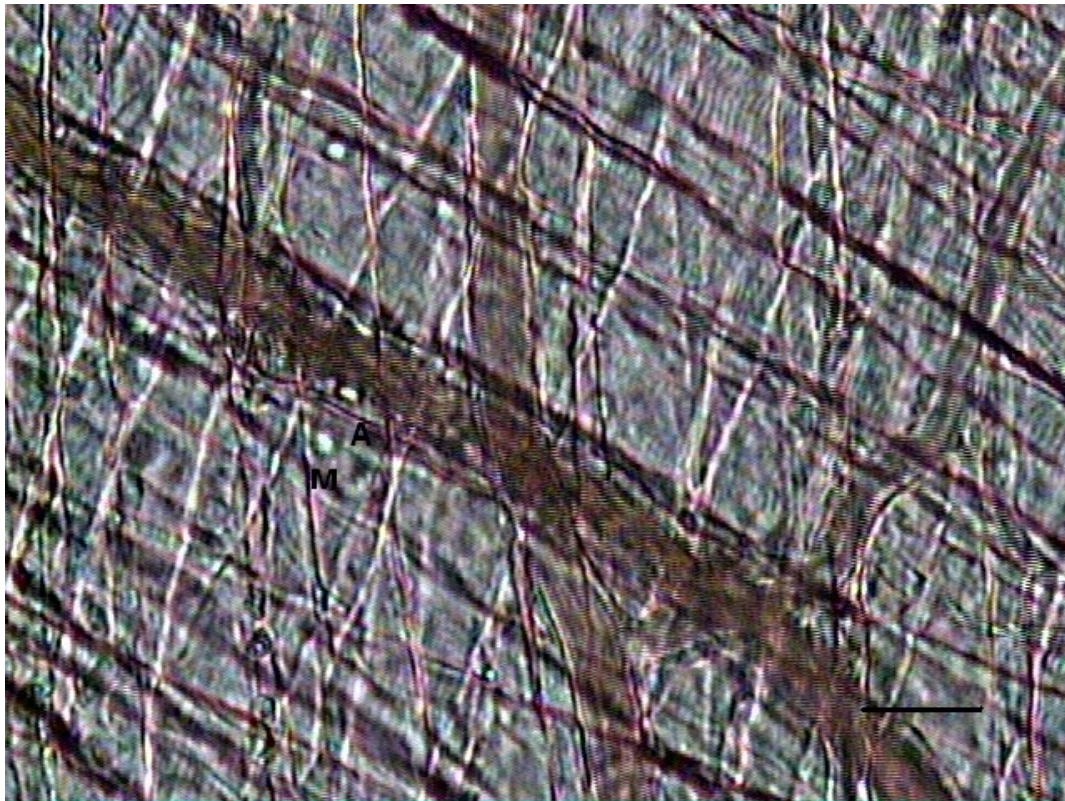


Figura 14. Efeito do pós-tratamento com o VCdt sobre a interação leucócito-endotélio, induzida por carragenina, na microcirculação do músculo cremaster de camundongos. Após 1 h da injeção de carragenina (cg) (15 mg/kg) no subcutâneo da bolsa escrotal, os animais receberam a injeção no subcutâneo de VCdt (1,5 µg/50 µL s.c.). Após 2 h, o cremaster foi exposto e sua microcirculação foi avaliada por microscopia intravital. Uma vênula pós-capilar (diâmetro de 20-40µm) foi selecionada e observada em cada animal. Os leucócitos em *rolling* foram contados durante um período de 1 min, 10 min após a exposição da microcirculação. Os leucócitos aderidos foram contados ao longo dos 100 µm do vaso e os leucócitos emigrados avaliados pela contagem das células presentes em uma distância de até 50 µm de cada lado do mesmo segmento vascular. Barra: 40µm. A: células aderidas ao endotélio. M: células migradas.

4.4. Efeito da ctx sobre a resposta inflamatória induzida por carragenina

Uma vez demonstrada a ação inibitória do VCdt sobre o desenvolvimento do edema de pata, sobre a migração de células e sobre a interação leucócito-endotélio, induzidos por carragenina, foi investigado o efeito da crotoxina, a principal toxina deste veneno, sobre os mesmos parâmetros avaliados para o VCdt.

Para tanto, a ctx foi isolada a partir do veneno total de *Crotalus durissus terrificus*, através da cromatografia de troca aniônica (MONO-Q). O veneno crotálico apresentou padrão cromatográfico com a presença de 3 picos principais. O pico 2, eluído entre 0,2 a 0,25 M de NaCl, continha cerca de 60% das proteínas totais retidas na coluna, correspondendo à eluição da crotoxina. Alíquotas do veneno (5 µg) e crotoxina (3 µg) foram então submetidas à SDS-PAGE 12%, sob condições não redutoras para avaliação do perfil eletroforético e pureza das frações isoladas. A concentração protéica da crotoxina foi dosada pelo método de Bradford. Foi obtido rendimento final em torno de 35 a 45% do total de proteínas submetidas à cromatografia. A análise do material em SDS-PAGE indica que a crotoxina pode ser considerada isenta de contaminantes.

4.4.1. Efeito do pré-tratamento com a ctx administrada pela via subcutânea sobre o desenvolvimento do edema de pata induzido por carragenina

A Figura 15 mostra que os animais tratados com a ctx (0,89 µg/50 µL) 1 h antes da injeção intraplantar de carragenina apresentaram uma redução no desenvolvimento do edema de pata em todos os tempos avaliados quando comparados ao grupo tratado com salina. Em relação ao segundo e mais intenso pico de edema, (72 h), essa inibição foi de 33% (ctx+cg: 18,77 ± 1,49; salina+cg: 28,00 ± 1,76; p< 0,05).

4.4.2. Efeito do pós-tratamento com a ctx, administrada pela via subcutânea, sobre o desenvolvimento do edema de pata induzido por carragenina

A Figura 16 mostra que o tratamento com a ctx 1 h após a injeção intraplantar de carragenina induz um decréscimo na porcentagem de edema em todos os tempos avaliados, quando comparado ao grupo tratado com salina. Um decréscimo de 30% do edema foi observado nos animais tratados com o VCdt 72 h após a injeção de carragenina (cg+ctx: 22,52 ± 1,62; cg+salina: 31.35 ± 2.05, p< 0,05).

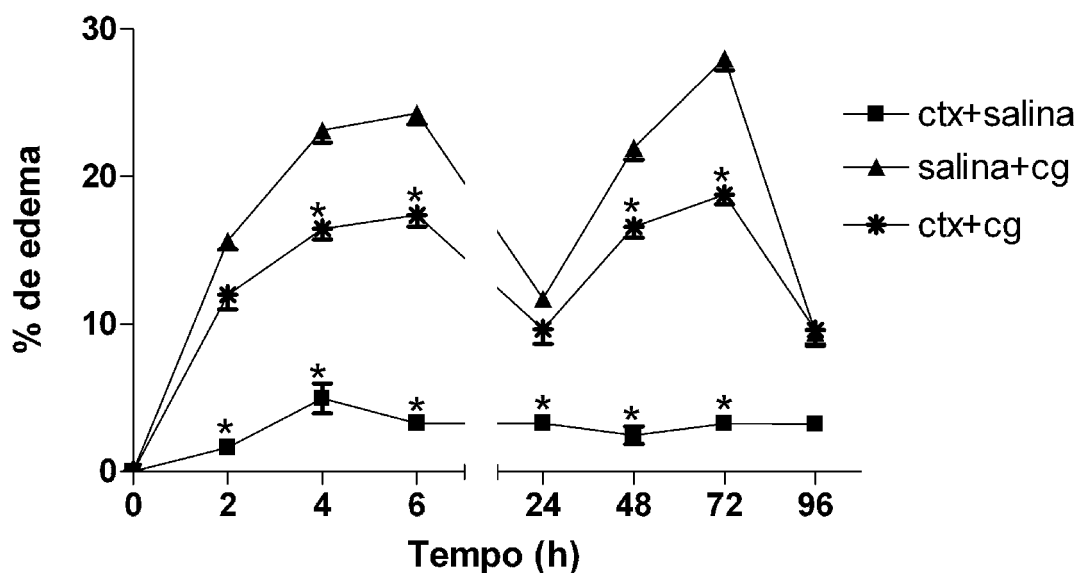


Figura 15. Efeito do pré-tratamento com a ctx sobre o desenvolvimento de edema de pata induzido por carragenina. Os animais foram tratados com a ctx (0,89 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ s.c.) ou salina 1 h antes da injeção intraplantar de carragenina (cg) (300 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$) ou salina. As espessuras das patas foram avaliadas em diferentes intervalos de tempo, usando um paquímetro. Os resultados foram expressos como média \pm S.E.M (n= 5 a 10 animais por grupo). *p < 0,05 estatisticamente diferente do grupo tratado com salina (salina + cg).

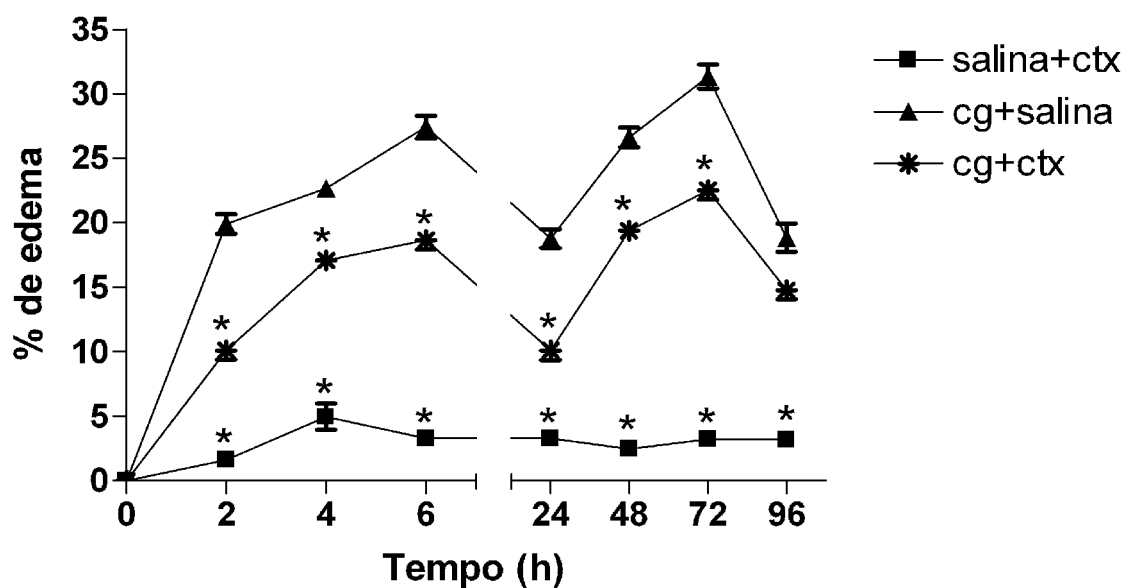


Figura 16. Efeito do pós-tratamento com a ctx sobre o desenvolvimento de edema de pata induzido por carragenina. Os animais foram tratados com a ctx (0,89 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ s.c.) ou salina 1 h após injeção intraplantar de carragenina (cg) (300 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$) ou salina. As espessuras das patas foram avaliadas em diferentes intervalos de tempo, usando um paquímetro. Os resultados foram expressos como média \pm S.E.M (n=5 a 10 animais por grupo). * $p < 0,05$ estatisticamente diferente do grupo tratado com salina (cg+salina).

4.4.3. Efeito do pré-tratamento com a ctx administrada pela via subcutânea sobre a migração celular induzida por carragenina

Os animais tratados com a ctx 1 h antes da injeção intraperitoneal de carragenina apresentaram uma redução de 38% no número total de células peritoneais quando comparados aos animais do grupo controle tratados com salina (ctx+cg: $0,89 \pm 0,09$; salina+cg: $1,43 \pm 0,12$; $p < 0,05$) (Fig 17A). Em relação à contagem diferencial, foi observado um decréscimo de 72% (ctx+cg: $0,31 \pm 0,02$; salina+cg: $1,12 \pm 0,13$; $p < 0,05$) (Fig. 17B) no número de polimorfonucleares, quando comparado ao grupo controle tratado com salina.

4.4.4. Efeito do pós-tratamento com a ctx administrada pela via subcutânea sobre a migração celular induzida por carragenina

A Figura 18 mostra que o tratamento com a ctx 1 hora após a injeção intraperitoneal de carragenina induziu uma redução de 34% no número total de células peritoneais em relação ao grupo controle tratado com salina (cg+ctx: $0,85 \pm 0,06$; cg+salina: $1,28 \pm 0,10$; $p < 0,05$) (Fig. 18A).

Em relação à contagem diferencial, foi observado um decréscimo de 40% na população de polimorfonucleares (cg+ctx: $0,34 \pm 0,18$; cg+salina: $0,56 \pm 0,06$; $p < 0,05$) (Fig. 18B).

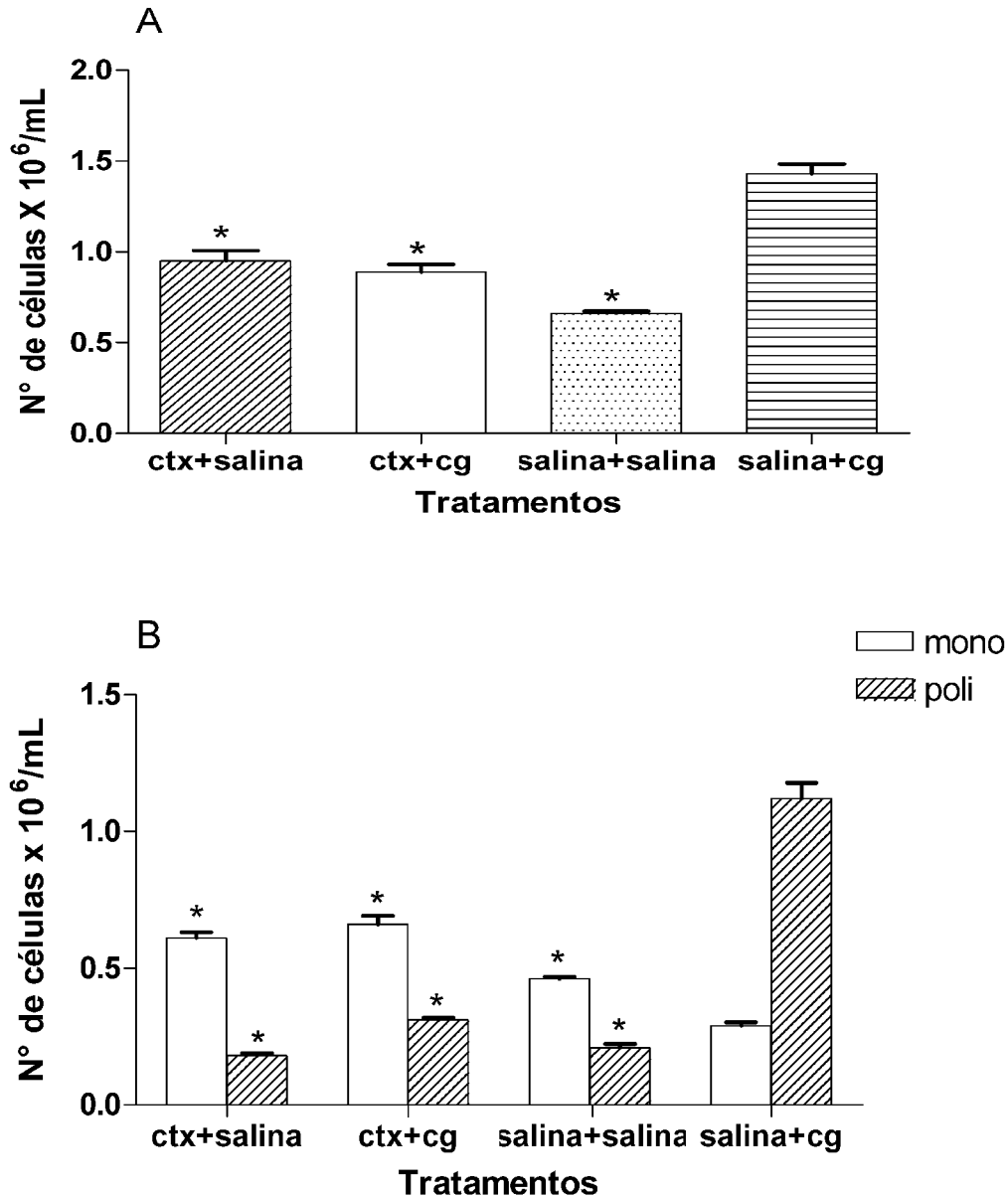


Figura 17. Efeito do pré-tratamento com a ctx sobre a migração celular induzida por carragenina. Os animais receberam o tratamento com a ctx (0,89 µg/50 µL s.c.) ou salina 1 h antes da injeção intraperitoneal de carragenina (cg) (300 µg/200 µL). A contagem total (A) foi realizada em câmara de Neubauer e a diferencial (B) em esfregaços corados pancromicamente a partir do exsudato peritoneal, coletado 4 h após a injeção intraperitoneal de carragenina ou salina. Os resultados foram expressos como média ± S.E.M (n= 5 animais por grupo). *p<0,05 estatisticamente diferente do grupo tratado com salina (salina+cg).

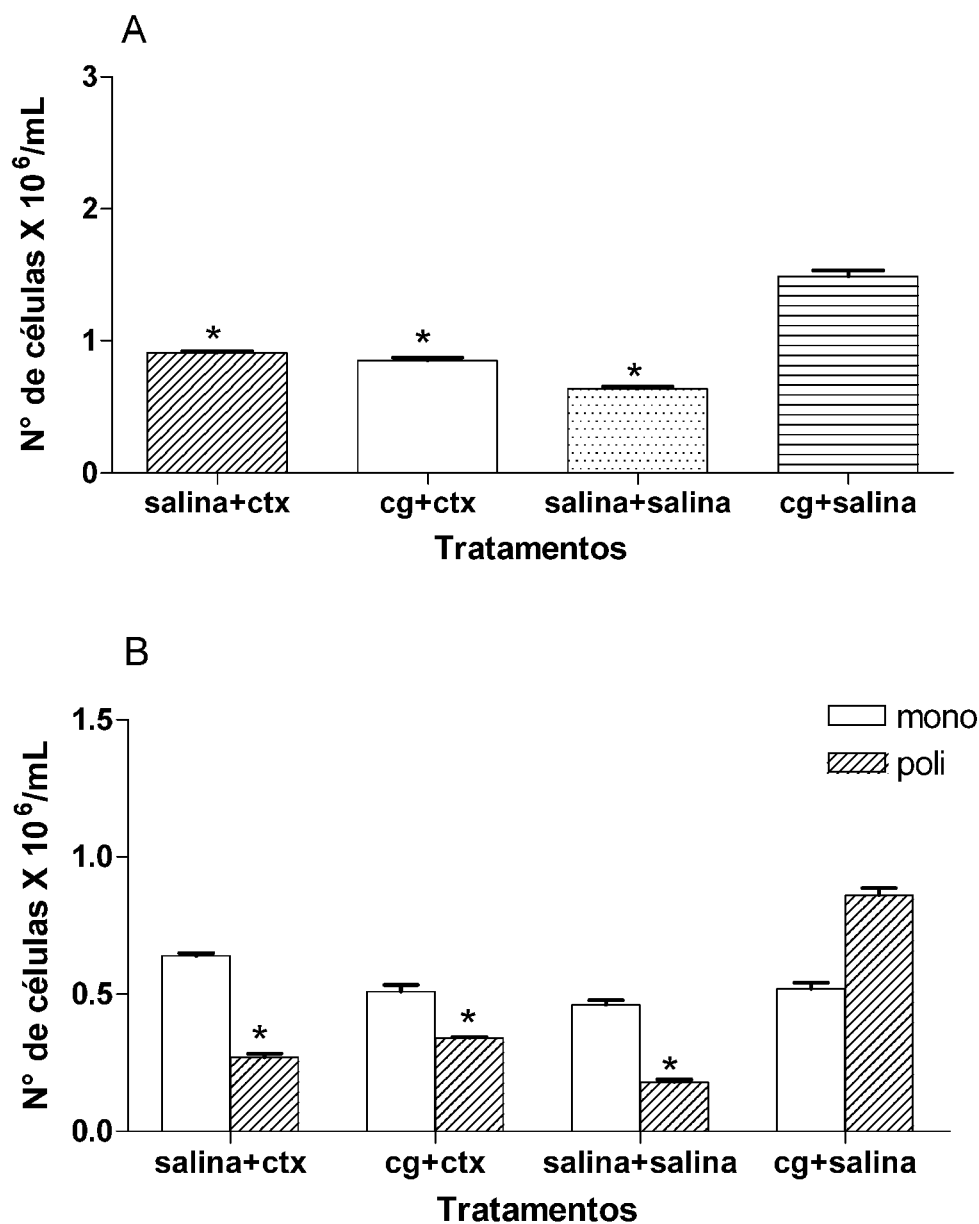


Figura 18. Efeito do pós-tratamento com a ctx sobre a migração celular induzida por carragenina. Os animais receberam o tratamento com a ctx (0,89 µg/50 µL s.c.) ou salina 1 h após a injeção intraperitoneal de carragenina (cg) (300 µg/50 µL). A contagem total (A) foi realizada em câmara de Neubauer e a diferencial (B) em esfregaços corados pancromicamente a partir do exsudato peritoneal, coletado 4 h após a injeção intraperitoneal de carragenina ou salina. Os resultados foram expressos como média ± S.E.M (n= 5 a 10 animais por grupo). *p< 0,05 estatisticamente diferente do grupo tratado com salina (cg+salina).

4.4.5. Efeito do pré-tratamento com a ctx administrada pela via subcutânea sobre a interação leucócito-endotélio na microcirculação do músculo cremaster de camundongos

Com o objetivo de avaliar o efeito da ctx, a principal toxina presente no VCdt sobre a interação leucócito-endotélio da microcirculação do músculo cremaster, foram avaliados os eventos celulares de *rolling*, adesão e migração celular, por meio da microscopia intravital. O efeito da ctx sobre a interação leucócito-endotélio na microcirculação do músculo cremaster foi avaliado duas horas após a injeção de carragenina ou salina no subcutâneo da bolsa escrotal. Neste período, os animais que receberam o tratamento com a ctx 1 h antes da injeção intraescrotal de carragenina, apresentaram um decréscimo de 80% no número de células aderidas ao endotélio (ctx+cg: $1,22 \pm 1,92$; salina+cg: $6,4 \pm 0,89$; $p < 0,05$) e de 77% no número de células migradas para o tecido extravascular (ctx+cg: $1,2 \pm 1,09$; salina+cg: $5,4 \pm 0,89$; $p < 0,05$) (Fig. 19). Ainda, os animais tratados com a ctx, apresentaram um discreto aumento no número de células em estado de *rolling* (ctx+cg: $9,20 \pm 0,28$; salina+cg: $5,00 \pm 2,00$, $p < 0,05$) quando comparados aos respectivos controles, tratados com salina (Fig. 20).

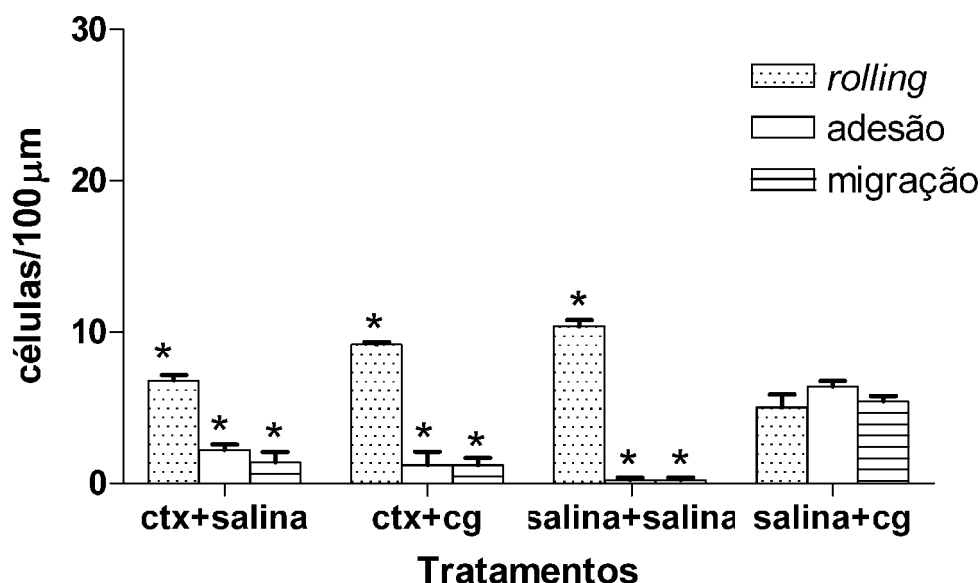


Figura 19. Efeito do pré-tratamento com a ctx sobre a interação leucócito-endotélio induzida por carragenina na microcirculação do músculo cremaster. Avaliação dos leucócitos em *rolling*, aderidos e migrados. Os animais receberam o tratamento com a ctx (0,89 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ s.c.) ou salina 1 h antes da injeção de carragenina (cg) (300 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$) ou salina no tecido subcutâneo da bolsa escrotal. Após 2 h, o cremaster foi exposto e sua microcirculação foi avaliada por microscopia intravital. Uma vênula pós-capilar (diâmetro de 20-40 μm) foi selecionada e observada em cada animal. Os leucócitos em *rolling* foram contados durante um período de 1 min após a exposição da microcirculação. Os leucócitos aderidos foram contados ao longo de 100 μm do vaso e os leucócitos emigrados avaliados pela contagem das células presentes a uma distância de até 50 μm de cada lado do mesmo segmento vascular. Os resultados foram expressos como média \pm S.E.M (n= 5 a 10 animais por grupo). *p< 0,05 estatisticamente diferente do grupo tratado com salina (salina+cg).

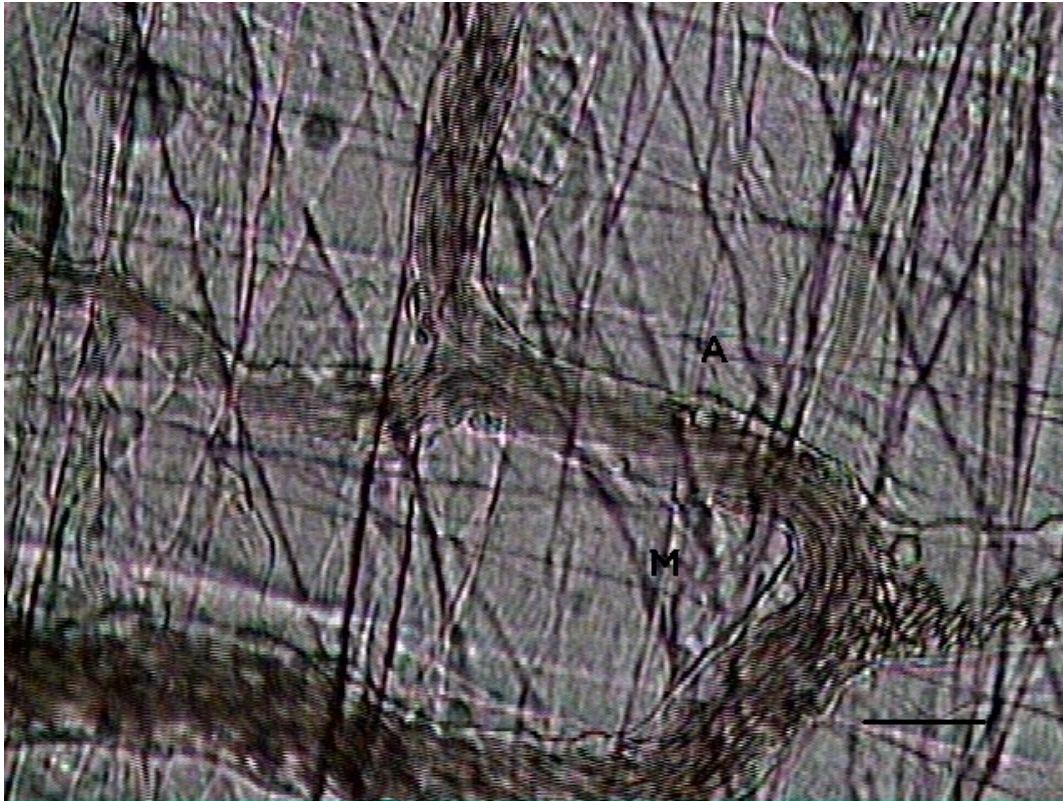


Figura 20. Efeito do pré-tratamento com a ctx sobre a interação leucócito-endotélio, induzida por carragenina, na microcirculação do músculo cremaster de camundongos. Após 1 h da injeção subcutânea de ctx (44 $\mu\text{g}/\text{kg}$), os animais receberam a injeção de carragenina (cg) (15 mg/kg) no subcutâneo da bolsa escrotal. Após 2 h, o cremaster foi exposto e sua microcirculação foi avaliada por microscopia intravital. Uma vênula pós-capilar (diâmetro de 20-40 μm) foi selecionada, e observada em cada animal. Os leucócitos em *rolling* foram contados durante um período de 1 min, após a exposição da microcirculação. Os leucócitos aderidos foram contados ao longo dos 100 μm do vaso e os leucócitos emigrados avaliados pela contagem das células presentes em uma distância de até 50 μm de cada lado do mesmo segmento vascular. Barra: 40 μm . A: células aderidas ao endotélio. M: células migradas.

4.4.6. Efeito do pós-tratamento com a ctx administrada pela via subcutânea sobre a interação leucócito-endotélio na microcirculação do músculo cremaster de camundongos

Os resultados demonstraram que a ctx, administrada 1 h após a injeção intraescrotal de carragenina induziu uma redução no número de células aderidas ao endotélio (cg+ctx: 8.5 ± 0.42 ; cg+salina: $13,4 \pm 0,74$; $p < 0,05$) como também no número de células migradas (cg+ctx: $2,2, \pm 0,66$; cg+salina: $5,2 \pm 0,48$; $p < 0,05$), sendo essa redução de 36% e de 57% respectivamente (Fig. 21). Em relação às células em estado de *rolling*, nenhuma diferença estatística significativa foi observada entre os grupos tratados com ctx e salina (Fig. 22).

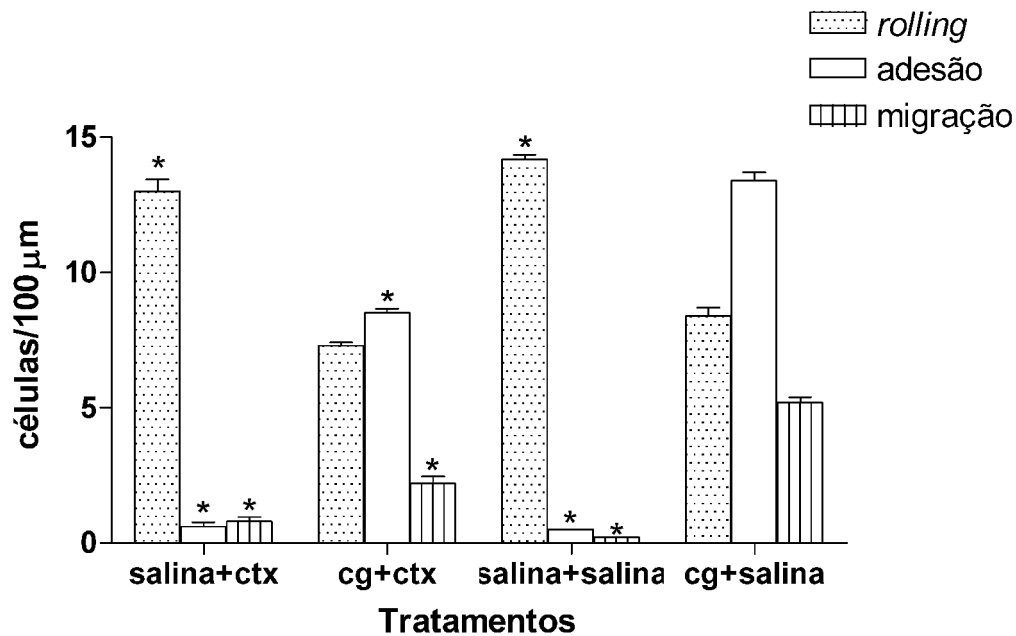


Figura 21. Efeito do pós-tratamento com a ctx sobre a interação leucócito-endotélio, induzida por carragenina na microcirculação do músculo cremaster. Avaliação dos leucócitos em *rolling*, aderidos e migrados. Os animais receberam o tratamento com a ctx (0,89 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ s.c.) ou salina 1 h após a injeção de carragenina (cg) (300 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$) ou salina no subcutâneo da bolsa escrotal. Após 2 h, o cremaster foi exposto e sua microcirculação foi avaliada por microscopia intravital. Uma vênula pós-capilar (diâmetro de 20-40 μm) foi selecionada e observada em cada animal. Os leucócitos em *rolling* foram contados durante um período de 1 min após a exposição da microcirculação. Os leucócitos aderidos foram contados ao longo de 100 μm do vaso e os leucócitos emigrados avaliados pela contagem das células presentes a uma distância de até 50 μm de cada lado do mesmo segmento vascular. Os resultados foram expressos como média \pm S.E.M (n= 5 a 10 animais por grupo). *p< 0,05 estatisticamente diferente do grupo tratado com salina (cg+salina).

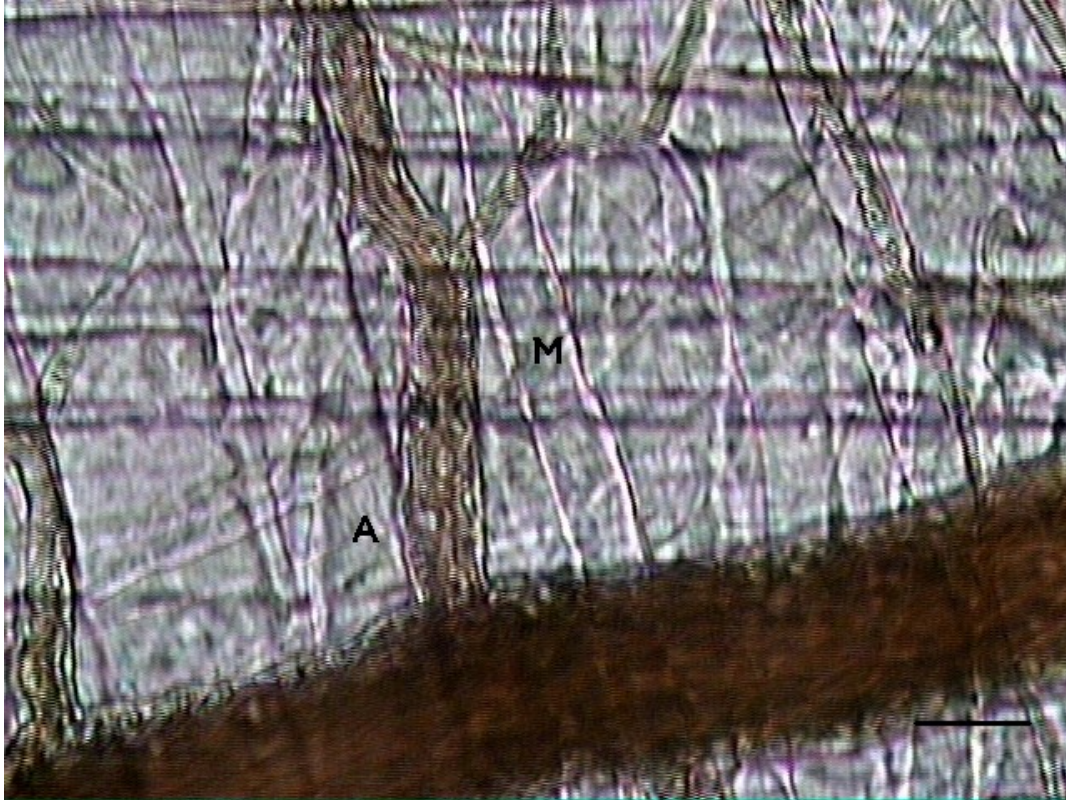


Figura 22. Efeito do pós-tratamento com a ctx sobre a interação leucócito-endotélio, induzida por carragenina, na microcirculação do músculo cremaster de camundongos. Após 1 h da injeção de carragenina (15 mg/kg) no subcutâneo da bolsa escrotal, os animais receberam a injeção no subcutâneo de ctx (44 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Após 2 h, o cremaster foi exposto e sua microcirculação foi avaliada por microscopia intravital. Uma vênula pós-capilar (diâmetro de 20-40 μm) foi selecionada e observada em cada animal. Os leucócitos em *rolling* foram contados durante um período de 1 min, após a exposição da microcirculação. Os leucócitos aderidos foram contados ao longo dos 100 μm do vaso e os leucócitos emigrados avaliados pela contagem das células presentes em uma distância de até 50 μm de cada lado do mesmo segmento vascular. Barra: 40 μm . A: células aderidas ao endotélio. M: células migradas.

5. Discussão

O presente estudo investigou o efeito do veneno de serpentes *Crotalus durissus terrificus* sobre a resposta inflamatória induzida por carragenina. Modelos experimentais usando a carragenina como agente inflamatório são amplamente utilizados para a investigação da fisiopatologia da resposta inflamatória aguda, como também para a caracterização de novas drogas antiinflamatórias (Winter *et al.*, 1962; Di Rosa *et al.*, 1971; Vinegar *et al.*, 1973; Posadas *et al.*, 2004).

A injeção intraplantar de carragenina em camundongos induz um edema bifásico. O primeiro pico é observado 6 horas após a injeção da carragenina, e o segundo e mais intenso ocorre 72 h após a injeção deste agente inflamatório (Henriques *et al.*, 1987; Posadas *et al.*, 2004). No presente estudo o desenvolvimento do edema induzido pela carragenina apresentou o mesmo perfil, confirmando assim as observações dos referidos autores.

Em relação ao efeito do VCdt sobre o edema, os dados apresentados neste estudo demonstraram que o pré-tratamento dos animais com o VCdt, 1 h ou 7 dias antes da injeção intraplantar de carragenina, inibe o desenvolvimento do edema de pata em todos os tempos avaliados, porém essa inibição foi maior no segundo pico (72 h). Ainda, o mesmo tratamento não alterou o perfil do edema, uma vez que o mesmo continua apresentando 2 picos, o primeiro na 6ª hora, e o segundo, mais tardio, na 72ª hora após a injeção da carragenina. Da mesma forma, o pré-tratamento dos animais com VCdt 14 dias antes da injeção de carragenina não inibiu o desenvolvimento do edema.

Os resultados demonstraram, ainda que o pós-tratamento dos animais com VCdt 1, 4 ou 48 h após a injeção intraplantar de carragenina, também inibiu o desenvolvimento do edema de pata. Além disso, cabe enfatizar que a administração do VCdt, 48 h após a injeção de carragenina, impede a formação do segundo pico de edema. Esses resultados mostram que, mesmo após a instalação da resposta inflamatória, o veneno inibe essa resposta.

Como citado na introdução, as manifestações uniformes que ocorrem durante o processo inflamatório decorrem da atuação de substâncias endógenas liberadas após o estímulo lesivo, denominadas mediadores químicos da inflamação, tais como: os componentes do sistema complemento, o sistema da coagulação e as cininas, a histamina, a serotonina, os metabólitos do ácido araquidônico, o fator de ativação plaquetário (PAF), o óxido nítrico (NO) e as citocinas que atuam de maneira inter-relacionada nos eventos da resposta inflamatória (Rocha e Silva & Garcia-Leme, 1972; Ferreira & Vane, 1973; Majno & Janes, 2004).

Os metabólitos do ácido araquidônico, tais como as prostaglandinas, tromboxanos leucotrienos e as lipoxinas gerados após um estímulo lesivo, ativam a enzima fosfolipase A_2 , que por sua vez degrada os fosfolídeos de membrana celular, gerando o ácido araquidônico. Este sofre ação de duas enzimas, as ciclooxigenases (COX-1 e COX-2) e as lipooxigenases, resultando então na formação dos prostanóides e dos leucotrienos, respectivamente (Cotran *et al.*, 1999; Rankin, 2004).

Henriques e colaboradores (1987) demonstraram que o edema de pata induzido pela carragenina em camundongos é mediado pela fosfolipase A_2 (FLA₂) e prostaglandina E_2 (PGE₂). Ainda, recentemente, foi demonstrado que

a mediação do edema induzido pela carragenina em camundongos difere nas duas fases. A primeira é caracterizada pelo aumento de óxido nítrico e a segunda pelo aumento da expressão de COX-2 e aumento dos níveis de PGE₂ (Posadas *et al.*, 2004).

Estudos experimentais demonstraram que algumas drogas antiinflamatórias, tais como a dexametasona e a indometacina, inibem o edema de pata induzido pela carragenina. Entretanto, essas drogas somente apresentam efeito antiinflamatório quando administradas 1 h antes da injeção de carragenina, ou quando administradas em doses consecutivas após a indução do edema (Henriques *et al.*, 1987; Bruno *et al.*, 2005; Recio *et al.*, 2006). Por outro lado, como foi demonstrado neste estudo, uma única dose de VCdt, administrada pela via subcutânea 7 dias antes da injeção de carragenina, ainda apresenta efeito inibitório sobre o desenvolvimento do edema. Esse resultado demonstra que o VCdt apresenta um efeito inibitório prolongado.

As drogas antiinflamatórias são amplamente utilizadas na caracterização de novas substâncias pró e antiinflamatórias. Assim, durante o desenvolvimento deste projeto, o efeito do VCdt foi comparado ao de drogas antiinflamatórias clássicas. Considerando a participação dos eicosanóides, bem como do óxido nítrico no edema induzido pela carragenina, o efeito do veneno foi comparado com as seguintes drogas antiinflamatórias: a dexametasona, a indometacina, o L-NAME e o nimesulide.

A dexametasona induz um aumento da síntese de lipocortina-1, uma proteína que tem efeito inibitório sobre a expressão da fosfolipase A₂, inibindo dessa forma a expressão de mediadores derivados do metabolismo do ácido araquidônico, tais como prostaglandinas e leucotrienos (Barnes & Adcock,

1993; de Faria *et al.*, 2001). A indometacina inibe a ação das ciclooxigenases, impedindo dessa forma a síntese de prostanóides (El Desoky, 2001). O nimesulide é um potente inibidor específico da ciclooxigenase-2 (Singla & Singh, 2000). O L-N^G-nitro arginine methyl ester (L-NAME), é um inibidor não seletivo da oxido nítrico sintetase (NOS), uma enzima que atua na formação do óxido nítrico.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que a administração do VCdt via subcutânea 1h após a injeção intraplantar de carragenina foi mais eficiente em inibir o edema de pata quando comparado com a dexametasona, a indometacina e o L-NAME. De fato, o VCdt inibiu ambas as fases do edema induzido pela carragenina, enquanto que a dexametasona, a indometacina e o L-NAME, inibiram somente a primeira fase. É importante enfatizar, que a dexametasona inibe as duas fases do edema, desde que a mesma seja administrada em doses consecutivas (Henriques *et al.*, 1987). Por outro lado, o efeito do VCdt e do nimesulide foram similares, uma vez que somente os dois inibiram as duas fases do edema.

A segunda fase do edema induzido pela carragenina difere da primeira pelo aumento da expressão de COX-2, que começa a ser detectada 24 h e atinge o pico 72 h após a injeção de carragenina, sendo que simultaneamente ocorre o decréscimo da produção de óxido nítrico (Posadas *et al.*, 2004). Considerando assim que, somente o VCdt e o nimesulide inibiram ambas as fases do edema, podemos sugerir que o VCdt assim como o nimesulide, provavelmente inibem a síntese de eicosanóides derivados da COX-2. Esses resultados indicam ainda que o VCdt apresenta uma ação inibitória sobre o edema de pata induzido pela carragenina mais eficaz do que as drogas

antiinflamatórias utilizadas neste estudo. Entretanto, para comprovar essa hipótese, serão realizados futuramente ensaios para determinar a potência da ação inibitória do VCdt, avaliando a dose efetiva 50% do VCdt em relação a das outras drogas antiinflamatórias.

A resposta inflamatória induzida por carragenina nas cavidades pleural e peritoneal é caracterizada por intensa exsudação plasmática e migração de células, particularmente de neutrófilos (Malech & Gallin, 1987). Assim, foi ainda objetivo deste estudo avaliar o efeito do VCdt sobre a migração celular induzida pela carragenina. Da mesma forma que relatado na literatura, no presente estudo foi observado um aumento da migração de células para a cavidade peritoneal, principalmente de polimorfonucleares 4 h após a injeção intraperitoneal de carragenina.

Em relação ao efeito do VCdt sobre a migração celular induzida pela carragenina, os resultados mostraram que, assim como observado para o edema, o VCdt inibiu a migração de células para a cavidade peritoneal induzida pela carragenina, quando administrado pela via subcutânea. Essa inibição foi observada tanto no pré-tratamento (21, 14, 7 dias ou 1 h), quanto no pós-tratamento (1 h) com VCdt. Como demonstrado pela contagem diferencial, essa inibição pode ser atribuída à redução da migração de polimorfonucleares. Esses resultados corroboram com os estudos anteriores que mostraram que o VCdt, quando administrado pela via subcutânea, inibe a migração de células para a cavidade peritoneal, induzida por tioglicolato (Sousa-e-Silva *et al.*, 1996).

Uma vez demonstrado que o VCdt, quando administrado pela via subcutânea, inibe o edema de pata e a migração de células para a cavidade

peritoneal, induzidos pela carragenina, foi objetivo do presente estudo avaliar se a administração do VCdt, por outra via, induziria o mesmo efeito inibitório. Assim, o VCdt foi administrado por via oral e seu efeito avaliado no modelo da migração celular.

Da mesma forma que o observado para a via subcutânea, o VCdt administrado pela via oral inibiu a migração de células para a cavidade peritoneal, induzida pela carragenina. Essa inibição também foi atribuída à redução do número de polimorfonucleares. Esses resultados sugerem que a via de administração do VCdt não interfere na sua ação inibitória sobre o influxo celular.

A literatura mostra que os mediadores derivados do metabolismo do ácido araquidônico participam da mediação da migração celular induzida pela carragenina (Saleh *et al.*, 1999). Além disso, outros estudos demonstraram que o tratamento com drogas antiinflamatórias tais como a dexametasona, a indometacina e o nimesulide inibem a migração de células para a cavidade peritoneal induzida pela carragenina (Dapino *et al.*, 1994; Arruda *et al.*, 2003).

Nesse sentido, assim como para o edema, o efeito inibitório do VCdt sobre a migração celular induzida pela carragenina foi comparado ao efeito antiinflamatório da dexametasona, indometacina e nimesulide, as quais inibem a síntese de eicosanóides. Os resultados mostraram que o VCdt apresenta o mesmo efeito inibitório das drogas antiinflamatórias utilizadas. Esses resultados sugerem que o VCdt compartilha da mesma via de inibição dessas drogas, inibindo a síntese de eicosanóides. Essa idéia é reforçada pelo fato de que a associação do VCdt com essas drogas, não potencializa a inibição da migração celular.

Os macrófagos desempenham um papel central durante o processo inflamatório. Essas células são os principais fagócitos do organismo e apresentam uma grande atividade secretória, uma vez que são capazes de secretar mais de cem substâncias biologicamente ativas (Takemura & Werb, 1984; Nathan, 1987; Rappolee & Werb, 1988). Dentre estas substâncias secretadas, incluem-se as citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6, IL-1 α e IL-1 β), as citocinas antiinflamatórias, (IL-4, IL-10, IL-13 e IFN- α) (Cavaillon, 2001; Bogdan, 2001) e outras substâncias que medeiam a migração dos leucócitos para o sítio da lesão, contribuindo para propagar a resposta inflamatória (Dinarello *et al.*, 1988; Nijsten *et al.*, 1987; Sundy *et al.*, 1999).

Além dos mediadores derivados do metabolismo do ácido araquidônico, citocinas como TNF- α , IL-6 e IL-1 β também estão envolvidas na mediação da migração celular induzida pela carragenina (Utsunomiya *et al.*, 1991; Cuzzocrea *et al.*, 1999).

Recentemente, estudos realizados pelo nosso grupo demonstraram que o VCdt inibe a secreção de citocinas IL-1 β e IL-1 α , secretadas por macrófagos peritoneais estimulados com LPS e pelo processo de fagocitose *in vitro* (Cury *et al.*, 2006). Assim, considerando a importância dos macrófagos no processo inflamatório e ainda o envolvimento das citocinas TNF- α e IL-1 β na migração celular induzida pela carragenina, podemos sugerir que o decréscimo da secreção dessas citocinas pró-inflamatórias pela ação do VCdt pode também contribuir para a inibição da migração celular induzida pela carragenina, observada no presente estudo.

A microscopia intravital vem sendo amplamente utilizada para a caracterização de agentes inflamatórios e para pesquisa de novas drogas

antiinflamatórias. Essa tecnologia permite visualizar a dinâmica dos eventos que ocorrem na microcirculação *in vivo*. Assim, esta técnica possibilita investigar as interações leucócito-endotélio, que ocorrem durante o processo inflamatório, observando os eventos celulares de *rolling*, adesão das células ao endotélio e migração celular para o tecido extravascular (Gavins & Chatterjee, 2004).

Nesse sentido, utilizamos a microscopia intravital para avaliar o efeito do VCdt sobre a interação leucócito-endotélio da microcirculação no músculo cremaster induzida pela carragenina.

Nossos resultados mostraram que o tratamento com o VCdt 1 h antes ou após a injeção de carragenina, reduziu o número de células aderidas ao endotélio e de células migradas para o tecido extravascular. Por outro lado foi observado um aumento do número de células em estado de *rolling*.

A interação leucócito-endotélio é dependente da expressão de diferentes famílias de moléculas de adesão, entre elas as selectinas e as integrinas. Essa expressão é responsável pelos eventos celulares de *rolling*, adesão e migração (Rampart, 1994). Baseados neste fato podemos sugerir que o VCdt pode interferir nos mecanismos envolvidos na adesão dos leucócitos ao endotélio, inibindo a expressão de moléculas de adesão, tais como as integrinas, ou modulando a liberação de mediadores envolvidos neste processo. Essa hipótese será investigada futuramente.

Dentre as toxinas presentes no veneno crotálico, a crotoxina é a principal delas, sendo responsável pela toxicidade do VCdt (Slotta & Fraenkel-Conrat, 1938; Bon *et al.*, 1989). Assim, uma vez demonstrada a ação inibitória do VCdt total sobre a resposta inflamatória induzida por carragenina, na etapa

seguinte do presente estudo foi investigar o efeito da crotoxina, sobre os mesmos parâmetros avaliados para o VCdt.

Da mesma forma que o VCdt total, a crotoxina inibiu o desenvolvimento de edema de pata e a migração de células para a cavidade peritoneal induzidos pela carragenina. Adicionalmente, como foi observado pela microscopia-intravital, a crotoxina alterou a interação leucócito-endotélio, na microcirculação do músculo cremaster inibindo a adesão das células ao endotélio e conseqüentemente as células migradas para o tecido extravascular. Considerando que a crotoxina representa aproximadamente 60% do veneno total (Slotta & Fraenkel-Conrat, 1938; Breithaupt, 1976) podemos sugerir, que este componente do VCdt contribui para o efeito inibitório do veneno total sobre os eventos vasculares e celulares da resposta inflamatória induzida pela carragenina. Entretanto, a ação dos demais componentes não deve ser descartada. A comprovação dessa hipótese deverá ser investigada. Esses dados corroboram com trabalhos recentes realizados pelo nosso grupo, os quais demonstram que a crotoxina, particularmente a sua subunidade a fosfolipase A₂, é o componente responsável pelo efeito inibitório do VCdt sobre a funcionalidade dos macrófagos peritoneais (Sampaio *et al.*, 2006), células relevantes no processo inflamatório.

Em conjunto, os resultados deste estudo demonstram pela primeira vez que uma única dose de VCdt, administrada pela via subcutânea ou pela via oral, induz um efeito antiinflamatório prolongado sobre os eventos vasculares e celulares da resposta inflamatória, inibindo o edema de pata e a migração celular induzida pela carragenina. Ainda, os dados sugerem que a crotoxina contribui para o efeito antiinflamatório do veneno. Cabe ressaltar que, em

relação ao efeito prolongado, os dados do presente estudo estão de acordo com trabalhos anteriores que demonstraram também um efeito inibitório prolongado do VCdt sobre a dor inflamatória induzida pela carragenina (Giorgi *et al.*, 1998; Picolo *et al.*, 2000) e sobre o espraiamento e fagocitose de macrófagos peritoneais (Sousa-e-Silva *et al.*, 1996).

Em estudos de biodistribuição do veneno de *Crotalus durissus terrificus* foi demonstrado que este veneno permanece no local da injeção 6 h após a sua administração no tecido subcutâneo, porém 4 h após a injeção o VCdt não é mais detectado em órgãos como rins, baço e cérebro (Gomes *et al.*, 2002). Baseado neste fato é difícil explicar como uma única dose de VCdt permanece por um longo período de tempo atuando como antiinflamatório no organismo. Todavia, podemos sugerir que o efeito antiinflamatório do VCdt é complexo e envolve provavelmente mecanismos que agem simultaneamente ou sinergisticamente. Esses mecanismos podem estar associados ainda à ação antiinflamatória do VCdt inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (Cury *et al.*, 2006), bem como modulando a produção de outros mediadores da resposta inflamatória. Corroboram para essa hipótese estudos recentes, os quais demonstram que o VCdt e a crotoxina induzem um aumento da produção de lipoxina A₄ por macrófagos peritoneais, um mediador lipídico com potente ação antiinflamatória (Sampaio *et al.*, 2006).

A comprovação da hipótese formulada acima deverá ser investigada futuramente, bem como a caracterização dos mecanismos no efeito antiinflamatório do VCdt.

Em conclusão, os resultados deste estudo evidenciam o efeito antiinflamatório do VCdt e da sua principal fração, a crotoxina. Além disso, os

resultados indicam que o VCdt pode ser um antiinflamatório em potencial, semelhante a outras drogas antiinflamatórias clássicas.

Os resultados ainda ampliam os conhecimentos referentes à ação modulatória do VCdt sobre a resposta inflamatória, demonstrando mais uma vez que o veneno de *Crotalus durissus terrificus* é uma ferramenta científica importante para a compreensão dos principais mecanismos endógenos envolvidos no processo inflamatório.

6. Resumo dos resultados

- ✓ O pré-tratamento com o VCdt (7 dias ou 1 h), assim como o pós-tratamento (48, 4 ou 1 h) inibiu o desenvolvimento do edema de pata induzido pela carragenina.
- ✓ O tratamento com o VCdt 1 h após a injeção de carragenina, assim como a dexametasona, a indometacina, o L-NAME e o nimesulide, inibiram o edema de pata induzido pela carragenina. Apenas o VCdt e o nimesulide inibiram a formação do primeiro pico e impediram a formação do segundo pico de edema de carragenina.
- ✓ Em relação à migração celular, o pré-tratamento (21, 14, 7 dias ou 1 h) ou o pós-tratamento (1 h) com o VCdt pela via subcutânea inibiu a migração de células para a cavidade peritoneal, induzida pela carragenina, principalmente de polimorfonucleares.
- ✓ O pós-tratamento (1 h) com o VCdt foi mais eficaz em inibir a migração de células peritoneais induzida pela carragenina, quando comparado ao tratamento de outras drogas antiinflamatórias específicas como a dexametasona, indometacina ou nimesulide.
- ✓ O pós-tratamento (1 h) com o VCdt, associado a drogas antiinflamatórias como dexametasona, indometacina e nimesulide não inibiu a migração de células para a cavidade peritoneal, induzida pela carragenina.
- ✓ O VCdt administrado pela via oral 14, 7 dias ou 1 h antes ou 1 h após a injeção de carragenina nos animais inibiu a migração de células peritoneais, principalmente de polimorfonucleares.

- ✓ Em relação à interação leucócito-endotélio na microcirculação do músculo cremaster, o pré-tratamento (1 h) ou o pós-tratamento (1 h) com o VCdt inibiu a adesão de células ao endotélio e a migração de células para o tecido extravascular.
- ✓ O pré-tratamento (1 h) ou pós-tratamento (1 h) com a ctx, inibiu o desenvolvimento do edema de pata induzido pela carragenina.
- ✓ O pré-tratamento (1 h) ou pós-tratamento (1 h) com a ctx, inibiu a migração de células para a cavidade peritoneal, induzida por carragenina principalmente de polimorfonucleares.
- ✓ Em relação à interação leucócito-endotélio na microcirculação do músculo cremaster, o pré-tratamento (1 h) ou o pós-tratamento (1 h) com a ctx inibiu a adesão de células ao endotélio e a migração de células para o tecido extravascular.

7. Conclusão

Como citado na introdução, o termo antiinflamatório é amplo e pode ser aplicado a drogas ou a substâncias que inibem um dos eventos inflamatórios induzidos experimentalmente. Assim, com base neste conceito, podemos concluir que o VCdt apresenta um efeito antiinflamatório prolongado sobre a resposta inflamatória induzida pela carragenina em camundongos. Os resultados indicam ainda que a ctx contribui para o efeito antiinflamatório do veneno.

Dessa forma, considerando que uma única dose de VCdt induz um efeito antiinflamatório que persiste por um período prolongado, podemos sugerir que este veneno representa uma nova perspectiva na terapêutica dos processos inflamatórios, bem como uma ferramenta científica para o estudo dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia da resposta inflamatória.

8. Resumo

O presente estudo investigou o efeito do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (VCdt) e da sua principal fração, crotoxina (ctx) sobre a resposta inflamatória induzida pela carragenina (cg). Foram avaliados o efeito do pré e do pós-tratamento com o VCdt sobre o desenvolvimento do edema de pata, a migração celular para a cavidade peritoneal e a interação leucócito-endotélio na microcirculação do músculo cremaster de camundongos induzidos por carragenina. O pré (14, 7 dias ou 1 h) e pós-tratamento (48, 4 ou 1 h) com o VCdt (1,5 µg/50 µL s.c.) inibiu o desenvolvimento do edema de pata induzido pela injeção intraplantar de carragenina em todos os tempos analisados (300 µg/50 µL). O mesmo efeito inibitório foi observado para o pré (21, 14, 7 dias ou 1 h) e pós-tratamento (1 h) com o VCdt (1,5 µg/50 µL s.c.) sobre a migração celular para a cavidade peritoneal induzida pela carragenina (300 µg/50 µL). A administração do VCdt por via oral (8,8µg/200µL) antes (14, 7 dias ou 1 h) ou após (1 h) a injeção de carragenina (300 µg/200 µL) também inibiu o influxo celular para a mesma cavidade. Em relação à interação leucócito-endotélio, o tratamento com o VCdt 1 h antes ou após a injeção de carragenina no subcutâneo da bolsa escrotal (300 µg/100 µL), aumentou o número de células em estado de *rolling*. Por outro lado, reduziu a adesão das células ao endotélio e a migração celular para o tecido extravascular. Da mesma forma que o VCdt, a ctx (0,89 µg/50 µL s.c.) administrada 1 h antes ou após a carragenina inibiu todos os eventos acima citados. Os efeitos inibitórios do VCdt sobre o edema e sobre a migração celular foi comparado ao de clássicas drogas antiinflamatórias: a dexametasona, a indometacina, o L-NAME e o nimesulide. Para o edema, foi observado que somente o VCdt e o nimesulide impediram a formação do segundo pico de edema de carragenina. Para a migração celular, não foi observada diferença entre o tratamento com o VCdt e as drogas antiinflamatórias. A associação do VCdt com as drogas antiinflamatórias acima citadas não potencializou as suas ações inibitórias sobre a migração celular. Os dados demonstram que o VCdt apresenta um efeito antiinflamatório prolongado, e ainda, que a ctx pode contribuir para o efeito antiinflamatório do VCdt.

Palavras-chave: *Crotalus durissus terrificus*; carragenina; inflamação; camundongos.

9. Abstract

In the present study, we investigated the effects of *Crotalus durissus terrificus* venom (CdtV) and crotoxin (ctx) on vascular and cellular events of inflammation induced by carrageenan (cg) in mice. It was evaluated the effect of the pre or post-treatment with CdtV on development of paw edema, cell migration and leukocyte-endothelium interaction at the cremaster muscle microcirculation induced by cg in mice. The pre (14, 7 days or 1h) and post-treatment (48, 4 or 1h) with CdtV (1,5 µg/50 µL s.c.), inhibited the paw edema induced by carrageenan (300 µg/50 µL) in all periods of time evaluated. The same inhibitory effect of CdtV (1,5 µg/50 µL s.c.) was observed to the pre (21, 14, 7 days or 1 h) and post-treatment (1h) on cell migration to the peritoneal cavity induced by cg (300 µg/200 µL). The oral administration of CdtV (8,8 µg/200 µL) before (14, 7 days or 1h) or after (1h) intraperitoneal injection of cg (300 µg/200 µL), also inhibited the cell influx to the same cavity. To evaluate leukocyte-endothelium interaction, the treatment with CdtV 1h before or after the cg injection (300 µg/100 µL) into the scrotal bag of the animals induced an increase in leukocyte *rolling*, but reduced the cellular adhesion to the endothelium surface and cellular migration to the extravascular tissue. The administration of ctx (0,89 µg/50 µL s.c.) 1 h before or after cg injection, could inhibit all inflammatory events mentioned above. The inhibitory effect of CdtV on paw edema and cellular migration were also compared with that observed for classical anti-inflammatory drugs, such as: dexamethasone, indomethacin, L-NAME and nimesulide. Only CdtV and nimesulide blocked the second peak of edema formation induced by cg. For cell migration, no differences were observed among the treatment with CdtV and anti-inflammatory drugs. The association of CdtV with drugs did not potentialize their actions on cell migration. These results demonstrate that CdtV exhibits a long-lasting anti-inflammatory effect and that ctx could contribute for the anti-inflammatory effect of CdtV.

Key words: *Crotalus durissus terrificus* venom; Inflammation; carrageenan, mice.

6. Referências bibliográficas

ALBEDA, S.M.; BUCK,C.A. Integrins and other cell adhesion molecules.

FASEB (Fed. Am. Soc. Biol. J.),v.4, 1990, p.286-80.

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

AMARAL, C.F.S.; REZENDE, N.A.; SILVA, O.A.; RIBEIRO, M.M.F.; MAGALHÃES, R.A.; REIS, R.J.; CARNEIRO, J.G.; CASTRO, J.R.S. Insuficiência renal aguda secundária a acidentes ofídicos botrópico e crotálico. Análise de 63 casos. **Rev. Inst. Trop. São Paulo**, v.28, n.4, p.220-227, 1986.

AMARAL, C.F.S.; MAGALHÃES, R.A.; REZENDE, N.A. Comprometimento respiratório secundário a acidente ofídico crotálico (*Crotalus durissus*). **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.33, n.4, p.251-255, 1991

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

AMORIM, M.F.; de MELLO, R.F.; SALIBA, F. Lesões renais induzidas experimentalmente no cão pelo veneno crotálico. **Mem. Inst. Butantan**, v.34, p.137-157, 1969.

ARAÚJO, F.A.A.; SANTALÚCIA, M.; CABRAL, R.F. Epidemiologia dos Acidentes por animais peçonhentos. In: CARDOSO, J.L.; FRANÇA, F.O.; FAN, H.W.; MÁLAQUE, C.M.; HADDAD, V., ed. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Savier, 2003, p.6-12.

ARRUDA, V.A.; FERREIRA DE ARAÚJO, M.; BON, C.; LOBO DE ARAÚJO, A. *Bothrops lanceolatus* (Fer de Lance) venom stimulates leukocyte migration into the peritoneal cavity of mice. **Toxicon**, v.41, p.99-107, 2003.

AUGER, M.J.; ROSS, J.A. The biology of the macrophage. In: Lewis, C.E.; MCGEE, J.O. D'. ed. **The Natural Immune System the macrophage**, Oxford, IRL press, 1992, p.3-74.

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.

AZEVEDO-MARQUES, M.M.; HERING, S.E.; CUPO, P. Evidence that *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) envenomation in humans causes myolysis rather than hemolysis. **Toxicon**, v.25, n.11, p.1163-1168, 1987.

BAEZ, S. An open cremaster muscle preparation for the study of blood vessels by in vivo microscopy. **Microvasc. Research**, v.5, n.3, p.384-94, 1973.

BARNES, J.P.; ADCOCK, I. Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. **Tips**, v.14, p.436-441, 1993

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

BECKER, T.L.; MARÓSTICA, M.; RIBEIRO, M.L.; de MENDONÇA, S.; GAMBERO, A.; JUNIOR, J.P. Pantoprazole treatment does not invoke anti-inflammatory properties in vivo. **International Immunopharmacology**, v.4, p.1051-1057, 2004.

BEVILACQUA, M.P.; STENGELIN, S. GIMBRONE, M.A.; SEED, B. Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. **Science**, v.243, p.1160-1165, 1989.

BEVILACQUA, M.P.; NELSON, R.M. Selectins. *J. Clin. Invest.* v.155, p.525-528, 1995

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

BON, C., BOUCHIER, C.; CHOUMET, V.; FAURE, G.; JIANG, M.S.; LAMBEZAT, M.P.; RADVANYI, F.; SALIOU, B. Crotoxin, half-century of investigations on a phospholipase A₂ neurotoxin. **Acta. Physiol Pharmacol Latinoam**, v.39, n.4, p.439-448, 1989.

BONNANS, C.; VACHIER, I.; CHAVIS, C.; GODARD, P.; BOUSQUET, J.; CHANEZ, P. Lipoxins are potential endogenous antiinflammatory mediators in asthma. **Am. J. Respir. Crit. Care Méd.**, v.165, p.1531-1535, 2002.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Anal Biochem.** v.7, n.72, p.248-54, 1976.

BREITHAUPT, H. Enzymatic characteristics of *Crotalus* phospholipase A₂ and the crotoxin complex. **Toxicon**, v.14, p.221-233, 1976.

BRUNO, A.; ROSSI, C.; MARCOLONGO, G.; DI LENA, A.; VENZO, A.; BERRIE, C.P.; Corda, D. Selective in vivo anti-inflammatory action of the galactolipid monogalactosyldiacylglycerol. **Eur J Pharmacol.**, v.524, p.159-168, 2005.

BUTCHER, E.C. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. **Cell**. v.67, n.6, p.1033-1036, 1991.

CARLOS, T.M.; HARLAN, J.M. Membrane proteins involved in phagocyte adherence to endothelium. **Immunol.Rev.**, v.4, p. 5-58, 1990.

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

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

CROWLEY, S.R. The pathogenesis of septic shock. **Heart Lung**, v.25, p.124-136, 1996.

CURY, Y.; SAMPAIO, S.C.; BRIGATTE, P.; CURI, R.; SOSA-E-SILVA, M.C.C. **Effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom and crotoxin on cytokine secretion by macrophage**. Abstract book of 15th World Congress on Animal, Plant and Microbial Toxins, Glasgow, Scotland, p.311, 2006.

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.

DAL SECCO, D.; PARON, J.A.; DE OLIVEIRA, S.H.P.; FERREIRA, S.H.; SILVA, J.S.; CUNHA, F.Q. Neutrophil migration in inflammation: nitric oxide inhibits rolling, adhesion and induces apoptosis. **Nitric Oxide.**, v.9, p. 153-164, 2004.

DANSKY, H.M.; BARLOW, C.B.; LOMINSKA, C. Adhesion of monocytes to arterial endothelium and initiation of atherosclerosis are critically dependent on vascular cell adhesion molecule-1 gene dosage. **Arteriosclerosis Thrombosis Vasc Biol.**, v.21, p.1662-1667, 2001.

DAPINO, P.; OTTONELLO, L.; DALLEGRI, F. The anti-inflammatory drug nimesulide inhibits neutrophil adherence to an migration across monolayers of cytokine activated endothelial cells. **Respiration**, v.61, n.6, p.336-341, 1994.

DE FARIA, L.; ANTUNES, E.; BON, C.; LOBO-DE-ARAÚJO, A. Pharmacological characterization of the rat paw edema induced by *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom. **Toxicon**, v.39, p.825-830, 2001.

DINARELLO, C.A.; KOCH, K.M.; SHALDON, S. Interleukin-1 and its relevance in patients treated with hemodialysis. **Kidney Int Suppl.**, v.24, p.S21-S26, 1988.

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.

DI ROSA, M. Biological properties of carrageenan. **J. Pharma. Pharmacol.**, v.24, p.89-102, 1972.

EL DESOKY, E.S. Pharmacotherapy of rheumatoid arthritis: An overview. **Curr Ther Res**, v.62, p.92-112, 2001.

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.

FILHO, J.C.F.A.; SANTOS, C.V.; CASTAMAN, T.A.; DE OLIVEIRA, J.R. Anti-inflammatory effects of fructose-1,6-biphosphate on carrageenan-induced pleurisy in rat. **Pharmacological Research**. v.49, p.245-248, 2004.

GAVINS, F.N.E.; CHATTERJEE, B.E. Intravital microscopy for the study of mouse microcirculation in anti-inflammatory drug research: Focus on the mesentery and cremaster preparations. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v.49, p.1-14, 2004.

GIORGI, R.; PAGANO, R.L.; DIAS, M.A.; AGUIAR-PASSETI, T.; SORG, C., MARIANO, M. Antinociceptive effect of the calcium-binding protein MRP-14 and the role played by neutrophils on the control of inflammatory pain. **J Leukoc Biol.**, v.64, p.214-220, 1998.

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.

GOMES, R.T.; CAMARGO, R.P.F.; VIOTTI, A.P.; TAVARES, A.P.; REVELO, M.P.; FREITAS, T.V. Comparison of the biodistribution of free or liposome-entrapped *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom in mice. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C.**, v.131, p.298-301, 2002.

GONÇALVES, L.R.; MARIANO, M. Local haemorrhage induced by Bothrops jararaca venom: relationship to neurogenic inflammation. **Mediators Inflammation.**, v.9, p.101-107, 2000.

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

HABERMANN, E.; BREITHAUPT, H. Mini-review the crotoxin complex- an example of biochemical and pharmacological protein complementation.

Toxicon, v.16, p.19, 1978.

HENRIQUES, M.G.; SILVA, P.M.; MARTINS, M.A.; FLORES, C.A.; CUNHA, F.Q., ASSREUY-FILHO, J.; CORDEIRO, R.S. Mouse paw edema. A new model for inflammation. **Braz J Med Biol Res** v.20, p.243-249,1987.

IANARO, A.; O'DONNELL, C. A.; DI ROSA, M.; LIEW, F. Y. A nitric oxide inhibitor reduces inflammation, down regulates inflammatory cytokines and enhances interleukin-10 production in carrageenin- induced oedema in mice.

Immunology., v.82, 370-375, 1994.

IUVONE, T.; OSSELAER, N.V.; D'ACQUISTO, F.; CARNUCCIO, R.; HERMANN, A.G. Differential effect of L-NAME and S-methyl-isothiourea on leukocyte emigration in carrageenin-soaked sponge implants in rat. **British Journal of Pharmacology**, v.121, p.1637-1644, 1997.

JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P. The immune system in health and disease; In: **Immunobiology**. New York: Ed. Current Biology/ Garland Publishing. 1994, p. 12-16.

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.

KOWAL-VERN, A.; WLANGA, J.M.; SHAPR-PUCCI, M.; HOPPENSTEADT, D.; GAMELLI, R.L. Postburn edema and related changes in interleukin-2, leukocytes, platelet activation, endotheli-1, and C1 esterase inhibitor. **J. Burn Care Rehabil**, v.18, p.99-103, 1997.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, n. 5259, p.680-685, 1970.

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 A₂. **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 A₂. **Toxicol.**, v.38, p.199-208, 2000.

LEVY, L. Carrageenan paw edema in the mouse. **Life Sci.**, v.8, p.601-606, 1969.

LEVY, B.D.; ROMANO, M.; CHAPMAN, H.A.; RELLY, J.J.; DRAZEN, J.; SERHAN, C.N. Human alveolar macrophages have 15-lipoxygenase and generate 15(S)-hydroxy-5,8,11-cis-13-trans-eicosatetraenoic acid and lipoxins. **J. Clin. Invest.**, v.92, p.1572-1579, 1993.

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.; BULLARD, D.C.; ARBONES, M.L.; BOSSE, R.; VESTWEBER, D.; TEDDER, T.F.; BEAUDET, A.L. Sequential contribution of L- and P-selectin to leukocyte rolling in vivo. **J. Exp. Med.**, v.181, n.2, p.669-675, 1995.

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.; PALADE, G. E. Studies on inflammation. I The effect of histamine and serotonin on vascular permeability: An electron microscopic study. **J. Biophys. Biochem. Cytol.**, v.11, p.571, 1961.

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, 2004, p.307-382.

MALECH, H.L.; GALLIN, J.I. Neutrophils in human diseases. **N. England. J. Med**, v.317, p.687-694, 1987.

MAYADAS, T.N.; JOHNSON, R.C.; RAYBURN, H.; HYNES, R.O.; WAGNER, D.D. Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P selectin-deficient mice. **Cell**, v.74, n.3, p.541-554, 1993.

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

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de diagnóstico de tratamentos de acidentes por animais peçonhentos**. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 1998, p.9-35.

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

MONCADA, S. The L-arginine: Nitric oxide pathway. **Acta Physiol. Scand**, v.145, p.201, 1992.

MONTANHER, A.B.; ZUCOLOTTO, S.M.; SCHENKEL, E.P.; FRÖDE, T.S. Evidence of anti-inflammatory effects of *Passiflora edulis* in an inflammation model. **Journal of Ethnopharmacology**, v.109, p.281-288, 2007.

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

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

NATHAN, C.F. Secretory products of macrophages. **J. Clin. Invest.**, v.79, p.319-26, 1987.

NIJSTEN, M.W.; DE GROOT, E.R.; TEN DUIS, H.J.; KLASSEN, H.J.; HACK, C.E.; AARDEN, L.A. Serum levels of interleukin-6 and acute phase responses. **Lancet** v.2, p.921, 1987.

ODA, T.; KATOKI, M.; HATANAKA, K.; NAGAI, Y. Inhibition of matrix metalloproteinase: analysis by intravital microscopy. **Mediators of Inflamm.** v.4, p.133-137, 1995.

OSBORN, L. Leukocyte adhesion to endothelium in inflammation. **Cell**, v.62, p. 3-6, 1990.

PICOLO, G.; GIORGI, R.; Cury, Y. Delta-opioid receptors and nitric oxide mediate the analgesic effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom. **Eur J Pharmacol.**, v.391, p.55-62, 2000.

PINHEIRO, R.M.; CALIXTO, J.B. Effect of the selective COX-2 inhibitors, celecoxib and rofecoxib in rat acute models of inflammation. **Inflammation Research**, v.51, p.603-610, 2002.

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.

RAMPART, M. Neutrophil-Endothelial Cell Interactions. In: BRAIN, S.D. **The Handbook of Immunopharmacology. Immunopharmacology of Microcirculation**. San Diego: Academic Press, 1994.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Fármacos antiinflamatórios e imunossupressores. Farmacologia.** 3º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997, p.194-200.

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

RAPPOLEE, D.A. & WERB, Z. Secretory products of phagocytes. **Curr. Opin. Immunol**, v.1, n.1, p.47-55, 1988.

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.

RECIO, M.C; CERDA-NICOLAS, M.; POTTERAT, O.; HAMBURGER, M.; RIOS, J.L. Anti-inflammatory and antiallergic activity in vivo of lipophilic *Isatis tinctoria* extracts and tryptanthrin. **Planta Med**, v.72, n.6, p. 539-46, 2006.

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

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

ROSENFELD. G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue: noções práticas sobre corantes pancrômicos e estudos de diversos fatores. **Mem. Inst. Butantan**, v.20: p.315-28, 1947.

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,1971, v.2,p.345-384.

SALEH, T.S.; CALIXTO, J.B.; MEDEIROS, Y.S. Effects of anti-inflammatory drugs upon nitrate and myeloperoxidase levels in the mouse pleurisy induced by carrageenan. **Peptides.**, v.20, p.949-956, 1999.

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, p.551-558, 2001.

SAMPAIO, S.C.; BRIGATTE, P.; SOUSA-E-SILVA, M.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, p.899-907, 2003.

SAMPAIO, S.C.; RANGEL-SANTOS, A.C.; PERES, C.M.; CURI, R.; CURY, Y. Inhibitory effect of phospholipase A₂ 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.

SANTORO, M.L.; SOUSA-E-SILVA, M.C.C.; GONÇALVES, L.R.C.; ALMEIDA-SANTOS, S.M.; CARDOSO, D.F.; LAPORTA-FERREIRA, I.L.; SAIKI, M.; PERES, C.A.; SANO-MARTINS, I.S. Comparison of biological activities in venom from three subspecies of South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*, *C. durissus cascavella* and *C. durissus collilineatus*). **Comp. Bioch. Physiol.**, v. 122, n.1, p.61-73, 1999.

SERHAN, C.N.; SHEPPARD, K.A. Lipoxin formation during human neutrophil-platelet interactions. Evidence for the transformation of leukotriene A₄ by platelet 12-lipoxygenase *in vitro*. **J. Clin. Invest.**, v.85, p.772-780, 1990.

SINGLA, A.K.; CHAWLA, M.; SINGH, A. Review Nimesulide: Some pharmaceutical and pharmacological aspects – An update. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.52, p.467-486, 2000.

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.

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

SPRINGER, T.A. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. **Annu. Rev. Physiol.** v.57, p.827-872, 1995.

SÜLEYMAN, H.; DEMIRCAN, B.; KARAGÖZ, Y.; ÖZTASAN, N.; SÜLEYMAN, B. Anti-inflammatory effects of selective COX-2 inhibitors. **Polish Journal of Pharmacology** v.56, p.775-780, 2004.

SUNDY, J.S.; PATEL, D.D.; HAYNES, B.F. Cytokines in normal and pathogenic inflammatory responses. In: Gallin, J.L., Snyderman, R. (Eds), **Inflammation: basic principles and clinical correlates**, Lippincott, Philadelphia, 1999, p.433-441.

SWINGLE, K.F.; MOORE, G.G.I.; GRANT, T.J. 4-Nitro-2-phenoxyethanesulfonamide (R 805): a chemically novel anti-inflammatory agent. **Arch Int. Pharmacodyn.**, v.221, p.132-139, 1976.

TAKEMURA, R.; WERB, Z. Secretory products of macrophages and their physiological functions. **Am. J. Physiol.**, v.246, p.C1-C9, 1984.

TAN-NO, K.; NAKAJIMA, T.; SHOJI, T.; NAKAGAWASAI, O.; NIJIMA, F.; ISHIKAWA, M.; ENDO, Y.; SATO, T.; SATOH, S.; TADANO, T. Anti-inflammatory effect of propolis through inhibition of nitric oxide production on carrageenin-induced mouse paw edema. **Biol. Pharm.Bull** v.29, p.96-99, 2006.

TAPPER, H. The secretion of preformed granules by macrophages and neutrophils. **J. Leukoc. Biol.**,v.59, p.613-20, 1996.

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

UTSUNOMIYA, I.; NAGAI, S.; OH-ISHI, S. Sequential appearance of IL-1 and IL-6 activities in rat carrageenin-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 carrageenin-induced pleurisy in the rat. **Proc.Soc.Exp.Biol.Med** ,v.143, p.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.

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.

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