

**IVANI APARECIDA DE SOUZA**

**"USO DO CAMUNDONGO COMO MODELO ANIMAL PARA O ESTUDO DAS  
ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS"**

**ORIENTADORA: Profa. Dra. GLACI RIBEIRO DA SILVA**

Tese apresentada à Faculdade  
Ciências Médicas no  
Departamento de Farmacologia  
da Universidade Estadual de  
Campinas-UNICAMP para a  
obtenção do grau de Mestre em  
Farmacologia.

**CAMPINAS**

**1993**

**So89u**

**20594/BC**

**UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL**

**Dedico esta Tese à DEUS e  
aos ANIMAIS que cederam  
suas vidas para a realização  
deste trabalho.**

Este exemplar corresponde à versão final da tese  
de Mestrado, apresentada a Faculdade de Ciências  
Médicas - UNICAMP, para obtenção do título de  
Mestre em Farmacologia da Bióloga Ivani Aparecida  
de Souza.

Campinas, 30 de novembro de 1993

Profª. Dra. Glaci Ribeiro da Silva

-Orientadora-

## **AGRADECIMENTOS**

A elaboração deste trabalho contou com a ajuda e colaboração de diversas pessoas. Gostaria de agradecer especialmente algumas delas:

À minha grande amiga e orientadora, Dra. Glaci Ribeiro da Silva, sempre presente e dedicada, agradeço em especial, pelos constantes ensinamentos, adquiridos durante todo o período de trabalho, que me direcionaram para a compreensão do espírito científico.

Aos meus pais, pelo estímulo constante à carreira científica.

Ao Prof. Dr. Merlin S Bergdoll, da Food Research Institute of Wisconsin (USA), pelo fornecimento da Enterotoxina estafilocócica do tipo B, sem a qual não seria possível a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Flores, pelo apoio, colaboração e ensinamentos e pelo exemplo de dedicação e conduta em um laboratório científico.

À Profa. Dra. Gun Birgitta Bergsten Mendes pela revisão e valorosas críticas na elaboração do texto final.

Ao Prof. Dr. Edson Antunes, pela amizade e incentivo. Agradecemos-lhe também, pela sua disponibilidade em nos fornecer várias das drogas utilizadas nesta Tese.

Ao Prof. Dr. Aquiles Eugênio Piedrabuena, pelo auxílio prestado na parte estatística da Tese.

Ao Dr. Stephen Hyslop, pelo auxílio na elaboração dos textos em inglês.

Ao Biólogo Joaquim Francisco do Prado, pela colaboração técnica e incentivo contínuo.

Ao grande amigo José Ernani Zambelli, companheiro de bancada, sempre presente, apoiando, sugerindo, dando idéias, ajudando, e acima de tudo dono de um excelente bom humor, cada vez mais raro e sempre necessário no dia a dia de trabalho.

À todos os colegas, companheiros e professores do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, que estão sempre prontos a colaborar, aconselhando, esclarecendo dúvidas, ajudando em experimentos; enfim, mantendo sempre um espírito de coletividade no qual todos lucram.

Ao Sr. Miguel Borges da Silva, pela sua dedicação, e enorme boa vontade, nos cuidados com os animais utilizados nos experimentos.

Aos funcionários da secretaria do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, em especial à Gislaine Elias Alipio, Solange Aparecida dos Santos Basso, Maria Rita de Lima, e Lázaro Gregório Nobre de Miranda, pela enorme contribuição e boa vontade mostradas

durante toda a execução deste trabalho.

Aos demais funcionários do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, pela ajuda, atenção e sobretudo pela grande amizade que nos uniu ao longo destes anos.

Ao CNPq que me concedeu bolsa de Mestrado.

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>8</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>9</b>
<b>Animais</b>	<b>9</b>
<b>Enterotoxina estafilocócica do tipo B (SEB)</b>	<b>9</b>
<b>Carragenina</b>	<b>9</b>
<b>Medida do edema de pata e da exsudação de azul de Evans</b>	<b>10</b>
<b>Pré-tratamento com drogas</b>	<b>11</b>
<b>A. Edema e exsudação medidos 4 h após a injeção do estímulo</b>	<b>11</b>
<b>B. Edema e exsudação medidos 48 h após a injeção do estímulo</b>	<b>12</b>
<b>C. Inibidores do metabolismo do ácido araquidônico</b>	<b>13</b>
<b>D. Anti-histamínicos</b>	<b>14</b>
<b>E. Anti-serotonínicos</b>	<b>15</b>
<b>F. Antagonista do fator de agregação plaquetária (PAF)</b>	<b>15</b>
<b>G. Depletor dos neuropeptídeos de fibras C sensoriais</b>	<b>15</b>
<b>Análise Estatística</b>	<b>15</b>
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>17</b>
<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>26</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b>	<b>37</b>
<b>7. RESUMO</b>	<b>38</b>
<b>8. SUMMARY</b>	<b>40</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>42</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Durante a década de 50, houve um aumento no interesse do estudo de toxinas bacterianas de ação entérica - as **enterotoxinas**. Estas toxinas são produzidas por diferentes tipos de microorganismos como, por exemplo, o *Staphylococcus aureus*, o *Vibrio cholerae*, o *Vibrio para-haemolyticus*, a *Escherichia coli*, as *Salmonellas sp*, o *Clostridium botulinum*, o *Clostridium perfringens*, etc. Estes estudos demonstraram que os produtos tóxicos que estes microorganismos produzem, são os verdadeiros responsáveis pelas patologias específicas induzidas por essas bactérias.

Os estafilococos são responsáveis por várias infecções no ser humano e também pela grande maioria das intoxicações alimentares (Bergdoll, 1983). Estas intoxicações são causadas por um grupo de enterotoxinas produzidas principalmente pelo *Staphylococcus aureus*. As enterotoxinas estafilocócicas (SEs) são exotoxinas, ou seja, são produzidas pelo microorganismo e lançadas no meio de cultura. Na maioria das vezes, as SEs são produzidas em pequenas quantidades, o que dificulta o processo de purificação das mesmas (Bergdoll, 1983).

As SEs são proteínas de baixo peso molecular (25000 - 30000 daltons), básicas, estáveis em meio ácido, e não inativadas pelo aquecimento. Todas elas possuem quase a mesma estrutura e quase a mesma sequência de amino ácidos, fato este que lhes confere atividades funcionais semelhantes; elas são, porém, individualizadas antigenicamente e classificadas em cinco grupos sorológicos: A (SEA), B (SEB), C (SEC), D (SED) e E (SEE) (Bergdoll, 1983, 1989; Iandolo, 1989). A SEB, é a SE produzida em maior quantidade e a

primeira a ser obtida de forma altamente purificada. Tanto sua sequência de aminoácidos, como seu peso molecular (28366 daltons) já foram determinados (Schantz e col., 1965; Wagman e col., 1965; Spero e col., 1965; Bergdoll, 1970; 1979). Como ilustração, mostramos na página 3 a sequência de aminoácidos da SEB, conforme trabalho de Bergdoll (1983).

As SEs são classificadas como neurotoxinas, pois seus efeitos parecem resultar de uma ação conjunta sobre a mucosa intestinal e sobre o centro do vômito, no sistema nervoso central (Bobak e Guerrant, 1992; Bergdoll e Chesney, 1991).

Os sintomas clínicos produzidos pelas SEs na intoxicação alimentar são observados somente em primatas; os mais evidentes são a diarreia e o vômito, sendo este último, o efeito patognomônico das enterotoxemias causadas pelas SEs.

O mecanismo de ação destas toxinas nas enterotoxemias ainda não foi claramente elucidado. Sabe-se que as SEs aumentam o influxo líquido para a luz intestinal e diminuem o tônus e a contratilidade deste órgão; a grande distensão intestinal causada por esse acúmulo de líquido parece ser a causa da diarreia produzida pelas SEs que, de fato, é praticamente aquosa (Shemano e col., 1967; Sullivan e col., 1971; Hendrix e col., 1970; Kapral e col., 1976; Koupal e Deibel, 1977; Bobak e Guerrant, 1992). Por outro lado, autores como Fleischer e col. (1989), acreditam que as SEs exercem seus efeitos pela liberação de mediadores inflamatórios na mucosa intestinal.

NH<sub>2</sub>-Glu-Ser-Gln-Pro-Asp-Pro-Lys-Pro-Asp-Glu-Leu-His-Lys-Ser-Ser  
 10  
 Asn-Asn-Tyr-Leu-Val-Lys-Met-Asn-Glu-Met-Leu-Gly-Thr-Phe-Lys  
 30 20  
 Asp-His-Val-Ser-Ala-Ile-Asn-Val-Lys-Ser-Ile-Asn-Glu-Phe-Phe  
 40  
 Asn-Gly-Leu-Lys-Thr-Asp-Lys-Ile-Ser-Tyr-Leu-Try-Ile-Leu-Asp  
 60 50  
 Tyr-Asp-Asn-Val-Arg-Val-Glu-Phe-Lys-Asn-Lys-Asp-Leu-Ala-Asp  
 70  
 Tyr-Tyr-Asn-Als-Gly-Phe-Val-Asp-Val-Tyr-Lys-Asp-Lys-Tyr-Lys  
 90 80  
 Gln-Cys-Tyr-Phe-Ser-Lys-Lys-Thr-Asn-Asn-Ile-Asp-Ser-His-Glu  
 100  
 His-Glu-Thr-Val-Gly-Gly-Tyr-Met-Cys-Thr-Lys-Arg-Lys-Thr-Asn  
 120 100  
 Gly-Asn-Asn-Gln-Leu-Asp-Lys-Tyr-Tyr-Arg-Ser-Ile-Thr-Val-Arg  
 130  
 Thr-Gln-Val-Asp-Phe-Ser-Leu-Leu-Asn-Lys-Gly-Asp-Glu-Phe-Val  
 150 140  
 Asn-Lys-Lys-Lys-Val-Thr-Ala-Glu-Gln-Leu-Asp-Tyr-Leu-Thr-Arg  
 160  
 Ser-Asn-Asn-Phe-Glu-Tyr-Leu-Lys-Lys-Asn-Lys-Val-Leu-Tyr-His  
 180 170  
 Pro-Tyr-Glu-Thr-Gly-Tyr-Ile-Lys-Phe-Ile-Glu-Asn-Glu-Asn-Ser  
 190  
 Gln-Asp-Phe-Lys-Asn-Gly-Pro-Ala-Pro-Met-Met-Asp-Tyr-Trp-Phe  
 210 200  
 Ser-Lys-Tyr-Leu-Met-Met-Tyr-Asn-Asn-Asp-Lys-Met-Val-Asp-Ser  
 220  
 (COOH)Lys-Lys-Lys-Thr-Thr-Leu-Tyr-Val-Glu-Ile-Lys-Val-Asp-Lys  
 230

Figura 1. Sequência de aminoácidos da SEB (Bergdoll, 1983).

Além dos seus efeitos gastro-intestinais, as SEs são agentes mitogênicos muito poderosos (Peavy e col., 1970; Bergdoll, 1979; Bergdoll e Chesney, 1991). Tais efeitos mitogênicos têm sido muito estudados, e são observados *in vitro* em linfócitos humanos e de camundongos. Eles estão relacionados com a capacidade de estas toxinas estimularem os linfócitos tipo T (Bobak e Guerrant, 1992; Grosman e col., 1990; Langford e col., 1978; Peavy e col., 1970; Smith e Johnson, 1975). Além de linfócitos T, as SEs estimulam monócitos, e são potentes liberadores das citocinas interleucina - 1 (IL-1) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF-alfa) (DeAzavedo e col., 1988; Fast e col., 1988; Jupin e col., 1988; Beisel, 1972; Van Miert e col., 1984; Parsonnet e col., 1985).

Um dos maiores problemas no estudo experimental de uma patologia é encontrar-se o chamado " modelo animal ", ou seja, um animal de laboratório no qual se possa reproduzir esta patologia. Os roedores usados rotineiramente em laboratório de pesquisa, como os ratos, os hamsters e os camundongos, por serem animais pequenos, relativamente baratos e de fácil manuseio e manutenção, são considerados ideais para serem usados como modelo animal.

Como o sintoma patognomônico das enterotoxemias por SEs é o vômito e, os roedores não vomitam, o animal usado para o estudo destas toxinas tem sido o macaco, um animal caro e de difícil manuseio. Esta falta de um modelo animal conveniente e de um sistema experimental adequado tem dificultado muito as investigações sobre o mecanismo de ação *in vivo* das SEs na intoxicação alimentar (Bobak e Guerrant, 1992; Bergdoll, 1970; 1979; Bergdoll e Chesney, 1991).

Várias tentativas têm sido feitas para encontrar um modelo animal e um sistema experimental mais adequado para estudar as SEs, porém, este assunto até agora, não foi satisfatoriamente resolvido. Em 1984, Van Miert e colaboradores descreveram alterações hematológicas e mudanças bioquímicas

no sangue de cabras injetadas endovenosamente (iv) com SEB, e propuseram o uso deste animal para o estudo destas enterotoxemias. Na cabra, a administração sistêmica de SEB produz, além dos sintomas gastro-intestinais, leucocitose, hemoconcentração, aumento da concentração sanguínea de uréia, queda na atividade da fosfatase alcalina sérica e queda nas concentrações sanguíneas de ferro e de zinco. Em 1985, Scheuber e colaboradores propuseram que, no macaco, ao invés do vômito, se usasse um outro sistema experimental para estudar as SEs. Estes autores verificaram que a administração intradérmica de SEB em macacos não sensibilizados, produzia uma reação de hipersensibilidade cutânea imediata (ou "pseudo-alergia" cutânea), que, da mesma forma que o efeito emético, era inibida por cimetidina e antagonistas de canal de cálcio.

Os mastócitos são as células alvo da SEB nesta "pseudo-alergia" cutânea; neles, a toxina age em receptores específicos de membrana liberando mediadores (Scheuber e col., 1985; Bamberg e col., 1986). Embora a histamina seja um dos mediadores liberados nesta reação cutânea, ela não parece ser o mediador predominante para a SEB, pois apesar da cimetidina inibir o vômito produzido pela toxina, ele não é afetado com o uso de anti-histamínicos do tipo H<sub>1</sub> (Scheuber e col., 1985).

Um outro grupo de mediadores liberados de mastócitos são os produtos da 5-lipoxigenação do ácido araquidônico, como, por exemplo, os cisteinil-leucotrienos (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> e LTE<sub>4</sub>). O envolvimento de cisteinil-leucotrienos na ação emética da SEB em macacos, foi bem documentada por vários autores (Scheuber e col., 1987; Denzlinger e col., 1986). Além disto, este mesmo grupo de pesquisadores (Scheuber e col., 1987 b) demonstrou que estas substâncias estão também envolvidas na " pseudo-alergia " cutânea que a SEB produz neste mesmo animal. Este estímulo não-imunológico que a SEB exerce sobre

mastócitos ocorre de modo indireto, através da substância P (Alber e col., 1989). Assim, primariamente, a SEB agiria em terminações nervosas sensitivas liberando substância P que, por sua vez, estimularia a secreção de mediadores mastocitários, como é o caso dos cisteinil-leucotrienos.

Os leucotrienos desempenham um papel importante no processo inflamatório local e em reações de hipersensibilidade imediata (Samuelsson, 1983; Davies e col., 1984; Ford-Hutchinson, 1985). O LTD<sub>4</sub>, um dos cisteinil-leucotrienos, quando administrado subcutaneamente (sc) em camundongos, em doses da grandeza de nanogramas, produz edema com exsudação de azul de Evans que não é afetado pela indometacina. Isto sugere que o LTD<sub>4</sub> é um dos mediadores da fase edematogênica do processo inflamatório no camundongo, e mostra também, a sensibilidade destes animais a este leucotrieno (Griswold e col., 1986). O fato de os camundongos usarem principalmente leucotrienos como mediadores inflamatórios foi também demonstrado por Young e col. (1984), que sugeriram o uso deste animal para o estudo de efeito edematogênico envolvendo produtos da lipoxigenação (LO) do ácido araquidônico (AA).

Como um dos maiores empecílhos para o estudo do mecanismo de ação *in vivo* das SEs, tem sido a falta de um modelo animal adequado (Bobak e Guerrant, 1992; Bergdoll, 1970; Van Miert e col., 1984), e como os efeitos característicos destas toxinas no macaco (vômito e pseudo-alergia cutânea), envolvem os cisteinil-leucotrienos, (Denzlinger e col., 1986; Sheuber e col., 1987 a,b; Sheuber e col., 1985; Alber e col., 1989), nós procuramos caracterizar farmacologicamente o edema de pata de camundongo produzido pela SEB, na tentativa de propor este sistema experimental e o uso deste roedor, como um novo modelo para o estudo das SEs.

A intoxicação alimentar com SEs dura cerca de 24 h e é acompanhada

por neutrofilia. As alterações linfocitárias que essas toxinas produzem (linfopenia inicial seguida de linfocitose), têm longa duração e são mais representativas dos fenômenos imunológicos induzidos pelas SEs (Zehavi-Willner e col., 1985). Por este motivo, nossos experimentos foram mais dirigidos para o edema de pata agudo produzido pela SEB.

## 2. OBJETIVOS

O objetivo desta Tese, foi caracterizar farmacologicamente o edema de pata agudo produzido pela SEB em camundongos, na tentativa de propor este roedor como um modelo-animal para estudar as SEs. Para isto, procuramos verificar possíveis paralelismos entre os efeitos locais produzidos pela SEB em camundongos, com o efeito emético e a "pseudo-alergia" cutânea que a toxina produz no macaco.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### Animais

Foram usados camundongos Swiss machos (20-25 g) provenientes do Biotério Central da UNICAMP. Esses animais foram mantidos no Biotério do nosso Departamento, sob ciclo de luz de 12 h, na temperatura de 24°C e recebendo água e alimentação *ad libitum*.

#### SEB

A SEB foi isolada de culturas de *Staphylococcus aureus*, foi purificada e, gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Merlin S Bergdoll da Food Research Institute, University of Wisconsin - Madison - USA. Todos os experimentos foram realizados usando-se o mesmo lote de toxina altamente purificada (pureza > 99%).

A solução-mãe da toxina foi dissolvida em salina (solução de NaCl a 0,45 % ) e mantida no freezer sob forma de alíquotas.

#### Carragenina

A Carragenina do tipo Lambda (Sigma CO., St Louis, MO) foi usada como controle-positivo de alguns dos experimentos. A droga foi dissolvida em salina. Em todos os experimentos usou-se soluções preparadas imediatamente antes do uso.

### **Medida do edema de pata e da exsudação de azul de Evans**

O edema de pata foi medido pelo método de Levy e col. (1986) e a exsudação de proteínas plasmáticas pelo método de azul de Evans (Griswold e col., 1986). Em cada experimento foram utilizados seis camundongos que eram usados tanto para medir o edema como o aumento de permeabilidade vascular. Após anestesia com éter, injetou-se na região subplantar da pata posterior esquerda (PE), 0,05 ml de SEB (6,25 - 50 ug) ou carragenina (125 - 500 ug), e o mesmo volume de veículo (salina) foi injetado na pata posterior direita (PD). Estes fenômenos foram analisados 1, 2, 4, 24, 48, 72, 96 h após a injeção do estímulo. Trinta minutos antes de serem sacrificados, os animais receberam, *iv*, 0,01 ml por grama de peso, de uma solução 0,25 % de azul de Evans. Os animais foram sacrificados por "over-dose" de éter e suas patas posteriores foram seccionadas com instrumental cirúrgico na articulação tíbio-tarsal. Logo em seguida, para evitar desidratação, os pesos da PE e da PD de cada animal foram determinados em balança analítica. O edema foi avaliado pela variação de peso em mg, de PE em relação a PD. Para a extração do azul de Evans extravasado, após a medida do edema, as patas foram picadas em tubos de ensaio contendo 3 ml de formamida. Estes tubos com formamida foram mantidos em banho-maria a 57 ° C por 24 h. A quantidade de azul de Evans extravasada foi determinada por espectrofotometria com leituras feitas em 619 nm, como recomendado por Bertland e col. (1993).

## Pré-tratamento com drogas

### A. Edema e exsudação medidos 4 h após a injeção do estímulo.

Foram utilizadas as seguintes drogas:

Indometacina (INDO), dexametasona (DEXA), BW 755C, BW A 4C, difenidramina (DPH), cimetidina (CMT), metisergida (MTS), Web 2086 e capsaicina (CPS).

- Esquema de tratamento:

Com exceção da CPS, cujo esquema está descrito a seguir, todas as demais drogas foram injetadas 1 h antes do estímulo.

INDO, DEXA, BW A4C, DPH, CMT, MTS, e WEB 2086 foram administradas sc, e o BW 755C foi administrado por via oral (vo) como recomendado por Randall e col.( 1980).

A administração de CPS seguiu o esquema descrito por Alber e col. (1989). A droga foi pincelada nas patas posteriores dos camundongos durante quatro dias seguidos. No primeiro dia de pré-tratamento, as patas desses animais foram pinceladas três vezes, ao passo que durante os dias restantes, foram feitas apenas duas aplicações. O estímulo somente foi aplicado dois dias após esta sequência de pré-tratamento.

## B. Edema e exsudação medidos 48 h após a injeção do estímulo.

Foram usadas as seguintes drogas:

INDO, DEXA, e BW 755C.

Esquema de tratamento:

A INDO e a DEXA foram injetadas sc, e o BW 755C foi administrado vo.

Tanto para o tratamento com INDO, como no tratamento com DEXA, foram realizadas cinco administrações com intervalo de 8 h entre a primeira e a segunda administração, 16 h entre a segunda e a terceira, 8 h entre a terceira e a quarta e 16 h entre a quarta e a quinta, conforme exemplificado abaixo:

Primeiro dia

9:00 h	10:00 h	17:00 h
INDO OU DEXA	SEB	INDO OU DEXA

Segundo dia

9:00 h	17:00 h
INDO OU DEXA	INDO OU DEXA

Terceiro dia

9:00 h	10:00 h
INDO OU DEXA	SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS

Para o tratamento com BW 755 C, foram feitas sete administrações, com intervalos de 4 h entre a primeira , a segunda e a terceira administração, 16 h entre a terceira e a quarta, 4 h entre a quarta , quinta e sexta , e 16 h entre a sexta e a sétima administração, conforme exemplificado abaixo:

#### Primeiro dia

9:00 h	10:00 h	13:00 h	17:00 h
BW 755C	SEB	BW 755C	BW 755C

#### Segundo dia

9:00 h	13:00 h	17:00 h
BW 755C	BW 755C	BW 755C

#### Terceiro dia

9:00 h	10:00 h
BW 755C	SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS

### **C. Inibidores do metabolismo do ácido araquidônico**

A INDO foi usada nas doses de 0,1 e 0,25 mg/kg (Henriques e col., 1987), com o intuito de promover uma inibição da ciclooxigenação (CO) do AA. A solução-mãe da droga na concentração de 1 mg/ml, foi feita em carbonato de sodio a 5 % e mantida no freezer (Curry e col., 1982) ; as diluições subsequentes, foram feitas em salina.

A DEXA foi usada na doses de 0,05 e 0,20 mg/kg (Henriques e col.,

1987), pela sua propriedade de inibir a enzima fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>). Esta droga foi preparada, no dia do experimento, a partir de ampolas da especialidade farmacêutica "DEXAMETASONA" (CEME), na concentração de 4 mg/ml. As diluições foram feitas em salina.

O BW 755C foi usado na dose de 50 mg/kg, pelo fato deste composto ser um inibidor tanto da CO como da LO do AA. Uma solução-mãe deste composto, foi feita, na concentração de 1mg/ml, sendo inicialmente dissolvida em 0,1 ml de etanol absoluto, e o volume final completado com salina. Em cada experimento partia-se desta solução-mãe, que era armazenada no freezer e as diluições subsequentes foram feitas também em salina. (Randall e col., 1980)

O BW A4C foi usado na dose de 50 mg/kg, para promover uma inibição específica da LO do AA (Tateson e col., 1988). Este composto foi dissolvido, imediatamente antes do uso, em 0,1 ml de dimetil sulfóxido e, o volume final completado com salina.

#### **D. Anti-histamínicos**

A DPH foi usada nas doses de 2 e 4 mg/kg (Scheuber e col., 1985) , para promover um antagonismo dos receptores de histamina do tipo H<sub>1</sub>. Esta droga foi dissolvida em salina no dia dos experimentos.

A CMT foi usada por ser um antagonista de histamina do tipo H<sub>2</sub>; a dose utilizada foi de 1 mg/kg (Scheuber e col., 1985). As diluições foram feitas, no dia do experimento, a partir de ampolas da especialidade farmacêutica "TAGAMET" (SMITH KLINE, BRASIL), na concentração de 150 mg/ml , usando-

se salina, como veículo .

#### **E. Anti-serotoninico**

Foi utilizado como anti-serotoninico a MTS na dose de 5 mg/kg (Scheuber e col., 1985). Esta droga foi dissolvida, no dia do experimento, em 0,1 ml de etanol absoluto, o volume final da solução foi completado com salina.

#### **F. Antagonista do fator de agregação plaquetária (PAF)**

Para isto foi utilizado o WEB 2086 (Casals - Stenzel e col., 1987) na dose de 50 mg/kg . Esta droga foi dissolvida em salina, imediatamente antes do uso.

#### **G. Depletor dos neuropeptídeos de fibras C sensoriais**

Usou-se para isto uma solução-mãe de CPS a 10 % que foi feita em etanol absoluto e mantida em geladeira. Para a aplicação tópica da droga ela foi diluída com Tween 80 e NaCl 0,15 Mol/L, na proporção de 1 : 1 : 8 (solução-mãe de CPS: Tween 80: NaCl 0,15 Mol/l). O controle para este experimento, foi feito com um grupo de animais que tiveram suas patas posteriores pinceladas com uma solução de etanol absoluto e Tween 80 (Alber e col., 1989).

### **Análise Estatística**

Os resultados de pré-tratamento foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis precedido por análise de variância (ANOVA) (Lowell Wine, 1966). Os

demais resultados, foram avaliados pelo teste de "t" Student pareado (Siegel , 1979). Em ambos os testes, o nível de significância considerado foi de 5%.

### **Drogas e Reagentes**

Cloreto de sódio, etanol absoluto, (MERK); Formamida (REAGEN); Azul de Evans (RIEDEL-DE-HAEN); Carragenina, Indometacina, Difenidramina, Trypan blue (SIGMA); Dexametasona (CEME); Cimetidina ("TAGAMET"-SMITH KLINE BRASIL); SEB foi gentilmente cedida pelo Prof Dr Merlin S Bergdoll da Food Research Institute, University of Wisconsin, Madison USA; O B WA4C o Dimetil sulfóxido (DMSO), a Metissergida e o Web 2086 foram gentilmente cedido pelo Prof. Dr Edson Antunes, do Depto de Farmacologia, Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP; BW 755 C foi gentilmente cedido pela Profa Dra Célia Regina Carlini, Depto de Bioquímica, ICB da U.F.R.J; Capsaicina foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr Charles Lindsey, do Depto de de Biofísica e Fisiologia, Escola Paulista de Medicina, São Paulo.

#### 4. RESULTADOS

Nossos resultados mostraram que a SEB, quando injetada na região subplantar da pata de camundongos, produziu edema e exsudação de azul de Evans. Na faixa de 6,25 - 50 ug/pata, tanto o edema como a exsudação se mostraram dose-dependentes (Figura 2).

Ainda nesta Figura podemos observar que a carragenina (CG), nosso controle-positivo, induziu um edema e exsudação de azul de Evans, que foi dose-dependente na faixa de 125 - 500 ug/pata. Esta dose-dependência ocorreu a partir da dose de 250 ug/pata.

Analisando-se a variação no tempo, podemos observar que o edema e a exsudação produzidos pela SEB (25 ug/pata), foram também tempo-dependentes no intervalo de 1 a 96 h (Figura 3). No entanto, estes fenômenos praticamente desapareceram 96 h após o estímulo com SEB (peso da pata em mg após 1 h:  $15 \pm 1,37^*$ , após 96 h:  $1,67 \pm 0,67$ ; exsudação de azul de Evans em ug/g, após 1 h:  $1,29 \pm 0,21^*$ , após 96 h:  $0,63 \pm 0,09^*$ ). A Figura 3, mostra ainda que estes fenômenos são bifásicos. A primeira fase teve uma duração aproximada de 24 h (edema e exsudação precoces) e atingiu um pico máximo 4 h após o estímulo com SEB (peso da pata em mg :  $20 \pm 1,46^*$ ; exsudação de azul de Evans em ug/g :  $2,24 \pm 0,32^*$ ). A segunda fase (edema e exsudação tardios), teve uma duração mais longa (aproximadamente 72 h) e o pico máximo, foi observado 48 h após a injeção de SEB (peso da pata em mg:  $25 \pm 1,70^*$  ; exsudação de azul de Evans em ug/g:  $2,53 \pm 0,32^*$ ). No entanto, é importante ressaltar que na fase precoce, estes efeitos observados 1h após o estímulo, já apresentavam valores muito próximos do pico máximo observado em 4 h (peso da pata em mg:  $15 \pm 1,37^*$ ; exsudação de azul de Evans em ug/g:  $1,29 \pm 0,21$ ), sugerindo que, provavelmente, esses eventos se iniciam logo após

a injeção local da toxina.

Podemos observar ainda na Figura 3 a variação temporal no edema e na exsudação produzidos por carragenina (controle-positivo). Contudo, não se observa neste caso um paralelismo entre o desenvolvimento do edema e da exsudação de azul de Evans, uma vez que a exsudação desapareceu 48 h após a injeção de carragenina, e o edema ainda se manteve.

Tanto a fase precoce, como a fase tardia do edema produzido pela SEB, parecem envolver os metabólitos do AA. Esta colocação se deve ao fato de que, quando pré-tratamos os animais com um inibidor da PLA<sub>2</sub>, como a DEXA (0,05 mg/kg e 0,2 mg/kg), houve uma inibição dose-dependente destes fenômenos. A dose de 0,2 mg/kg levou a uma inibição total do edema precoce, porém o mesmo não ocorreu em relação a exsudação que foi bloqueado somente parcialmente. Também se observou inibição do edema, e uma tendência a inibição da exsudação de azul de Evans (embora não significativa para a exsudação precoce), quando fizemos o pré-tratamento com o inibidor dual da CO e da LO do AA, o BW 755C (Figuras 4 e 5).

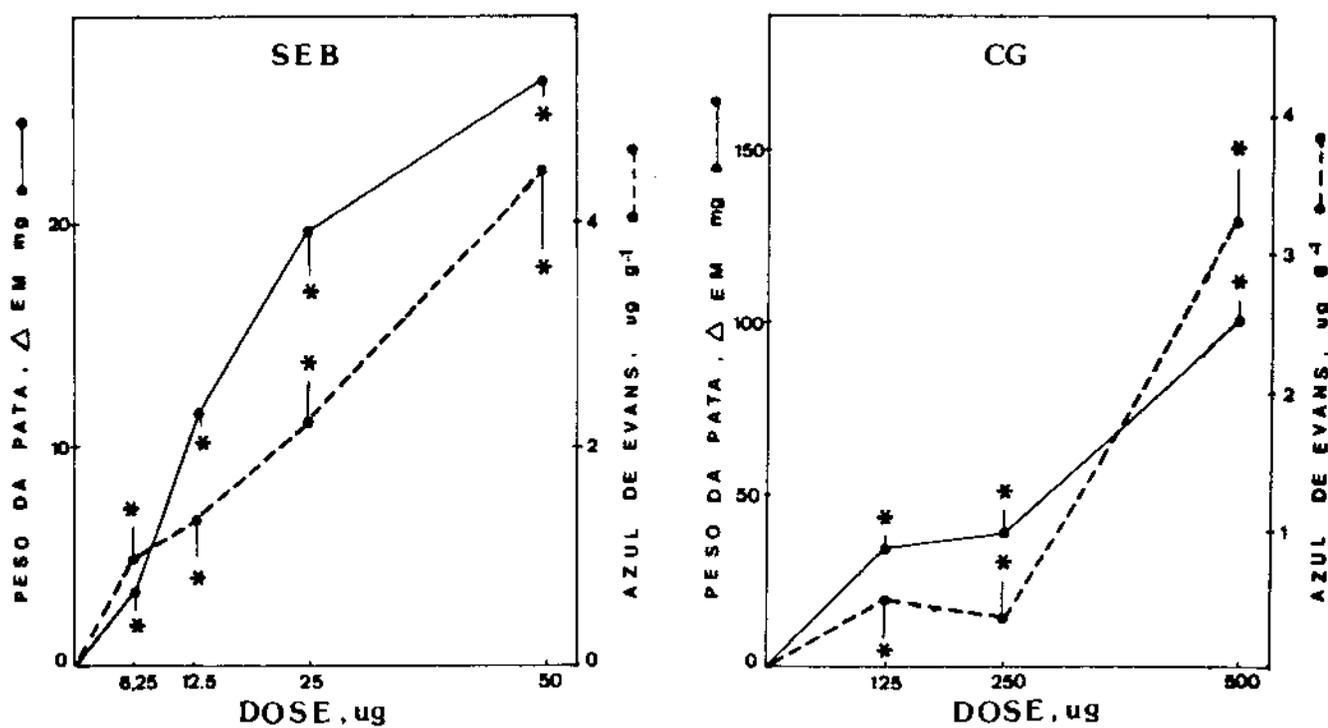
Através do uso de inibidores específicos para estas duas vias de metabolização do AA, pudemos observar ainda que, os metabólitos da LO parecem estar envolvidos nos fenômenos precoces observados com a SEB, pois o inibidor específico de LO, o BW A4C na dose de 50 mg/kg, se mostrou capaz de inibir este efeitos na fase precoce, praticamente na mesma proporção que a menor dose de DEXA (0,05 mg/kg) (Figura 4), e da mesma forma que o BW 755C na exsudação houve apenas uma tendência a inibição. O pré-tratamento dos animais com duas doses diferentes de um inibidor específico de CO, a INDO, não alterou o edema e a exsudação precoces. Por outro lado, na fase tardia o pré-tratamento com INDO (0,1 mg/kg e 0,25 mg/kg), produziu uma inibição dose-dependente deste efeitos (Figuras 4 e 5).

Nossos resultados mostraram também, que os receptores histamínicos  $H_1$ , podem estar envolvidos nestes efeitos produzidos pela SEB, pois a DPH na dose de 4 mg/kg foi capaz de inibir o edema e a exsudação produzidos pela toxina de uma forma dose-dependente, embora tenha causado uma inibição maior no edema do que na exsudação. Observou-se ainda que, o antagonismo dos receptores de histamina do tipo  $H_2$ , conseguido com o pré-tratamento com CMT, inibiu significativamente o edema e a exsudação induzidos pela enterotoxina no camundongo (Figura 6).

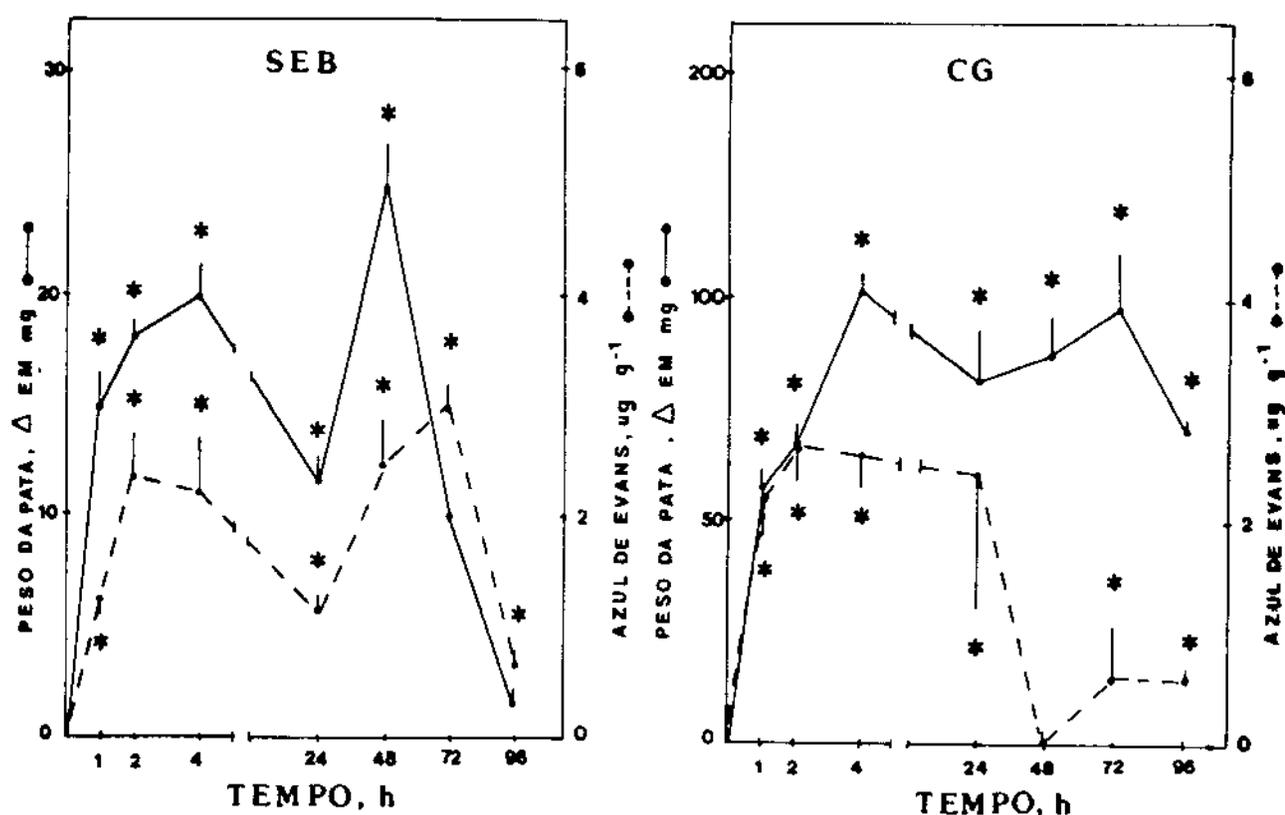
Ainda nesta Figura podemos observar que a MTS, um anti-serotonínico, somente inibiu a exsudação de azul de Evans produzida pela SEB, sem interferir significativamente, no edema.

O antagonista do PAF ( composto WEB 2086), administrado previamente aos animais, foi capaz de bloquear tanto o edema como a exsudação de azul de Evans que a toxina produziu.

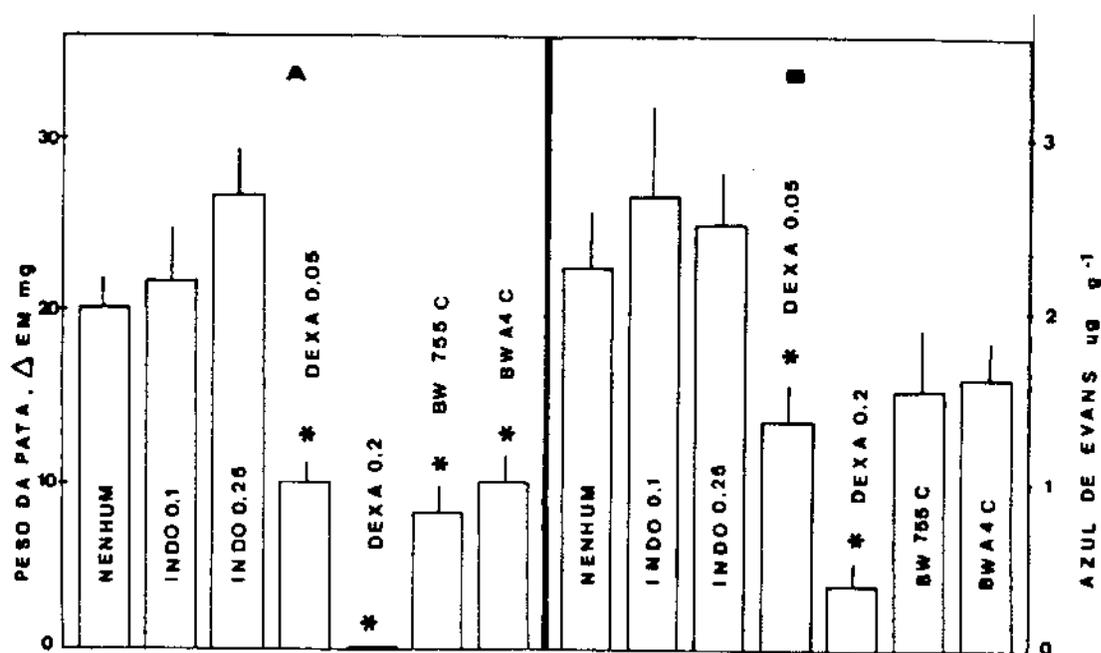
Na Figura 7 observamos os efeitos da CPS, uma substância capaz de depletar os neuropeptídeos de fibras C sensoriais, entre eles a substância P (SP). Esta Figura nos mostra que, tanto o edema como a exsudação, foram inibidos pela CPS.



**Figura 2- Dose-dependência do edema e da exsudação induzidos pela SEB em camundongos.** Painel A: SEB; Painel B: carragenina (CG). A SEB ou a CG foram injetadas na região subplantar, nas doses indicadas. Tanto o edema como a exsudação, foram avaliados 4 h após. Cada ponto representa a média  $\pm$  SEM da variação de peso entre a pata tratada e a pata controle de seis animais. \*  $p < 0,05$ , em relação ao Controle (teste de "t" Student pareado).



**Figura 3.-** Variação temporal do edema e da exsudação produzidos pela SEB em camundongos. Painel A: SEB; Painel B: carragenina (CG). A SEB (25 ug/pata) ou a CG (500 ug/pata) foram injetadas na região subplantar; o edema e a exsudação foram avaliados nos tempos indicados. Cada ponto representa a média  $\pm$  SEM da variação de peso entre a pata tratada e a pata controle de seis animais. \*  $p < 0,05$ , em relação ao Controle (teste de "t" Student pareado).



**Figura 4.- Efeito do pré-tratamento com drogas anti-inflamatórias sobre o edema e a exsudação de azul de Evans precoces produzidos pela SEB (25 ug/pata) em camundongos. Painel A : edema ; Painel B : exsudação . As drogas indicadas na Figura acima foram administradas de acordo com o esquema descrito em Materiais e Métodos. Cada barra representa a média  $\pm$  SEM de seis animais. \*  $p < 0,05$ , em relação ao grupo sem pré-tratamento (Nenhum);(teste de Kruskal-Wallis precedido de ANOVA).**

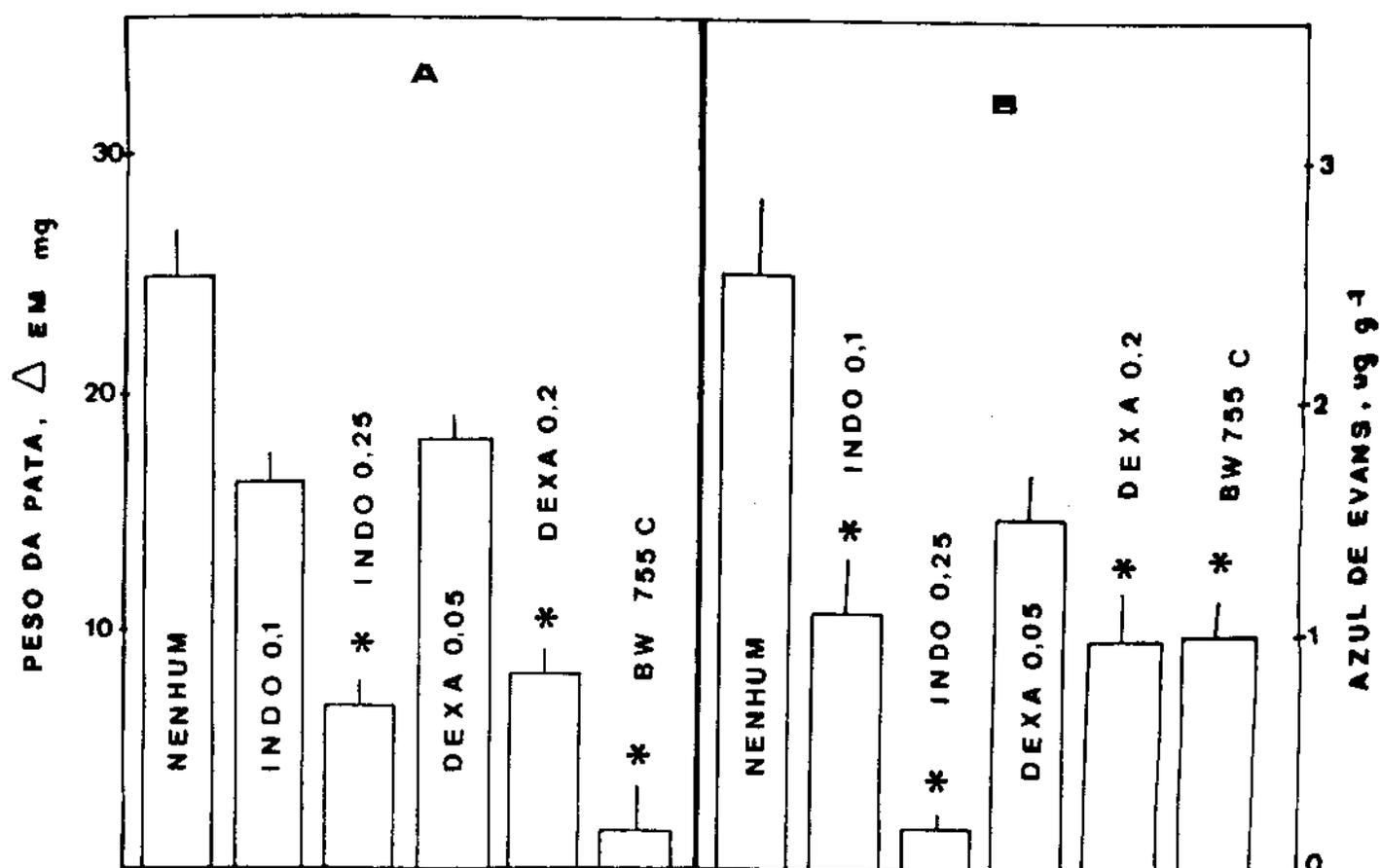


Figura 5.- Efeito do pré-tratamento com drogas anti-inflamatórias sobre edema e a exsudação de azul de Evans tardios produzidos pela SEB (25  $\mu\text{g/pata}$ ) em camundongos. Painel A: edema ; Painel B : exsudação . As drogas indicadas na Figura acima foram administradas de acordo com o esquema descrito em Materiais e Métodos. Cada barra representa a média  $\pm$  SEM de seis animais. \*  $p < 0,05$ , em relação ao grupo sem pré-tratamento (Nenhum);(teste de Kruskal-Wallis precedido de ANOVA).

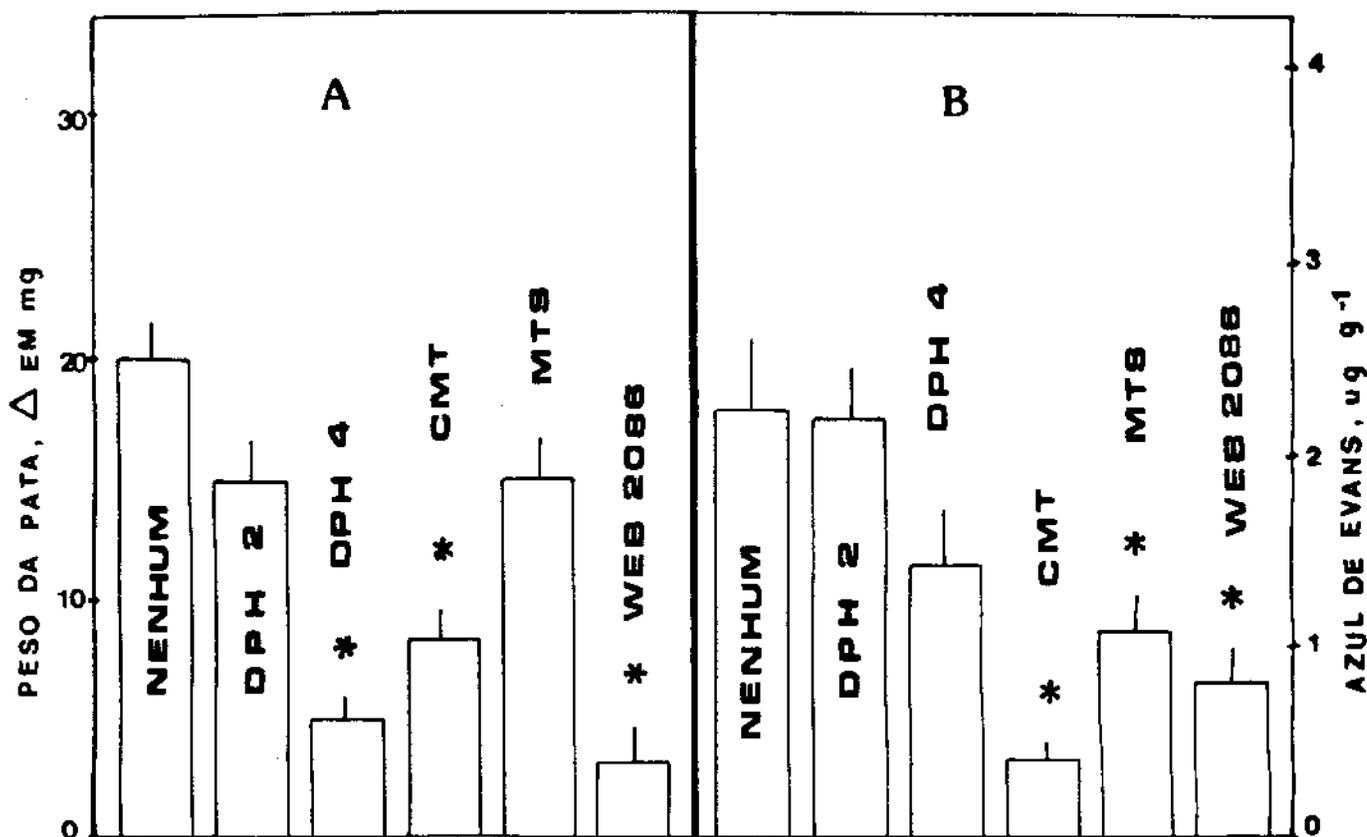


Figura 6. Efeito do pré-tratamento com anti-histamínicos, com anti-serotonínico e com inibidor de PAF, sobre o edema e a exsudação precoces produzidos pela SEB (25  $\mu$ g/pata) em camundongos. Painel A : edema ; Painel B : exsudação. DPH (2 e 4 mg/kg), CMT (1 mg/kg), MTS (5 mg/kg) ou WEB 2086 (50 mg/kg) foram injetados *sc* 1 h antes da injeção local de SEB. Cada barra representa a média  $\pm$  SEM de seis animais. \*  $p < 0,05$ , em relação ao edema e a exsudação sem pré-tratamento (Nenhum); (teste de Kruskal-Wallis precedido ANOVA).

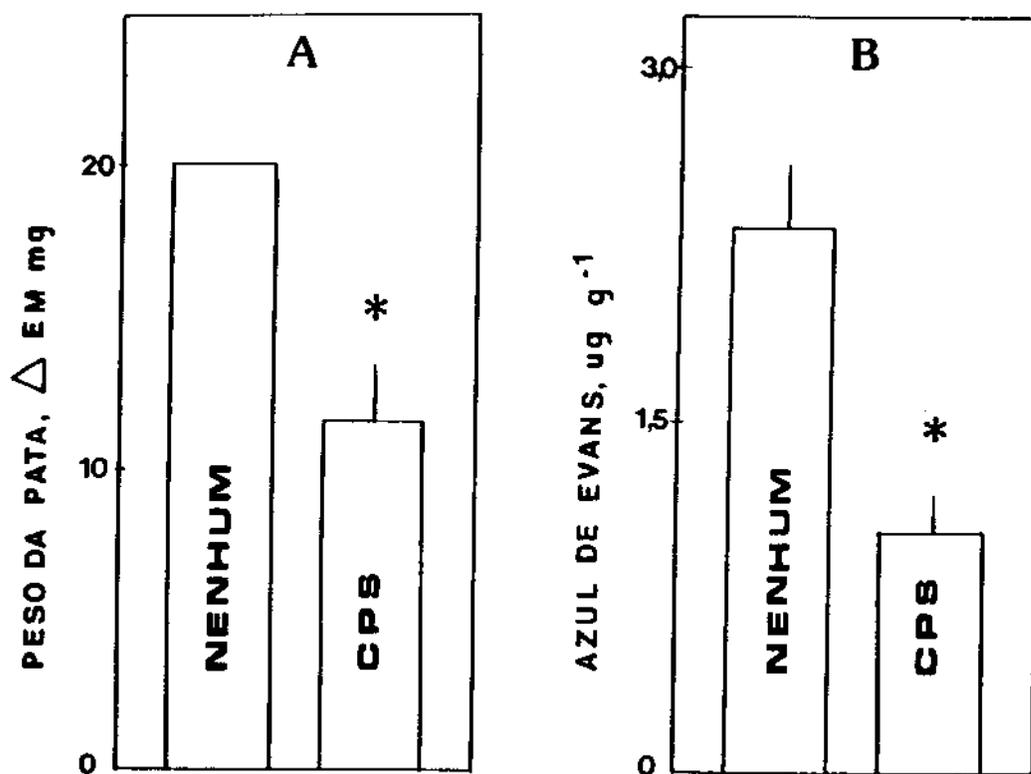


Figura 7. - Efeito do pré-tratamento com capsaicina no edema e na exsudação precoces produzidos pela SEB (25  $\mu\text{g/pata}$ ) em camundongos. Painel A : edema ; Painel B : exsudação. A capsaicina foi aplicada tópicamente durante quatro dias conforme descrito em Materiais e Métodos. O estímulo com SEB foi feito dois dias após o término deste pré-tratamento. Cada barra representa a média  $\pm$  SEM de seis animais. \*  $p < 0,05$ , em relação ao grupo sem nenhum pré-tratamento (Nenhum); (teste de Kruskal-Wallis precedido de ANOVA).

## 5. DISCUSSÃO

A injeção intraplantar de SEB em camundongos induziu edema na pata desses animais. O fenômeno foi dose e tempo - dependente e envolveu vários mediadores inflamatórios. Este efeito flogístico da SEB teve uma duração longa e se desenvolveu de um modo bifásico.

De acordo com Robbins (1989) e Rang e Dale (1993), o edema é a principal manifestação clínica de uma reação inflamatória e dele, participam eventos vasculares e celulares. Ele se caracteriza por um acúmulo de líquido em um tecido intersticial ou em uma cavidade serosa. Quando o acúmulo de líquido ocorre no tecido intersticial da pata de um animal (camundongo, por exemplo), o edema pode ser medido pelo aumento de peso (método de Levy e col., 1986) ou de volume desta pata (método pletismográfico).

As alterações vasculares do edema inflamatório ocorrem na seguinte sequência:

1. Vasoconstrição arteriolar: é efêmera e nem sempre ocorre.
2. Vasodilatação: ela é fundamental e caracteriza as mudanças hemodinâmicas iniciais do processo inflamatório, como, o aumento de temperatura local e a hiperemia. O aumento de volume sanguíneo resultante da vasodilatação eleva a pressão hidrostática no interior dos vasos produzindo uma saída de líquido desses vasos para o tecido intersticial. Este líquido, praticamente isento de proteínas, é chamado transudato. O transudato ocorre sem que haja alteração na permeabilidade vascular. Os principais mediadores inflamatórios envolvidos nesta vasodilatação são a histamina, a bradicinina, a serotonina, o PAF, a prostaciclina, o fator de relaxamento endotelial (EDRF),

etc.

3. Aumento de permeabilidade vascular: esta alteração na permeabilidade dos vasos promove a saída de proteínas e células sanguíneas para o tecido intersticial e, se denomina exsudação. A histamina e o PAF, estão envolvidos também na fase inicial do aumento de permeabilidade vascular. Outros mediadores inflamatórios envolvidos são, por exemplo, as cininas, as citocinas, a SP, e os eicosanóides.

Portanto, as alterações vasculares produzem edema tanto por transudação como por exsudação, sendo, porém, a exsudação a principal característica do edema inflamatório.

Das células envolvidas na inflamação, algumas são normalmente encontradas nos tecidos (células endoteliais vasculares, mastócitos e macrófagos teciduais), enquanto outras como, as plaquetas e os leucócitos, têm acesso ao local através do sangue.

O processo inflamatório agudo tem duração relativamente curta (máxima de 24 - 48 h); nele, há um predomínio de eventos vasculares e o neutrófilo é o tipo principal de célula envolvida.

O processo inflamatório crônico tem uma duração mais longa e caracteriza-se pela infiltração de linfócitos e macrófagos e pela proliferação de vasos e tecido conjuntivo.

O azul de Evans, por ser um corante que se liga as proteínas, é usado como um indicador para a saída destas substâncias do interior dos vasos para o tecido intersticial (Robbins, 1989; Rang e Dale, 1993). Este é o racional teórico do método de Griswold e col. (1986), que foi usado em nossos experimentos para medir a exsudação.

Na pata do rato, o extravasamento de proteínas plasmáticas observado com o uso de carragenina, é máximo com 1 h decaindo em seguida (Garcia

Lema e col., 1973); no camundongo porém, este extravasamento continua por mais de 24 h (Franco e Morley, 1976). Isto parece explicar os dados que obtivemos com a SEB na pata de camundongo, pois a exsudação de azul de Evans que a toxina produziu, foi também de longa duração (96 h), como pode ser observado na Figura 3.

A variação temporal e a dose-dependência do edema e da exsudação produzidos pela SEB (Figuras 2 e 3) mostrou um paralelismo muito grande entre estes dois fenômenos, sugerindo que eles poderiam ser eventos dependentes. No entanto, este paralelismo deixou de ser observado nos experimentos de pré-tratamento que fizemos com as diferentes drogas. Assim, por exemplo, embora a DEXA na dose de 0,2 mg/kg tenha inibido completamente o edema, o mesmo fato deixou de ser observado em relação à exsudação, onde a inibição, embora significativa, foi somente parcial (Ver Figura 4).

Este fato, bastante estranho, da DEXA inibir totalmente o edema e só parcialmente a exsudação (Figura 4), poderia ser explicado pela metodologia que usamos para avaliar a exsudação. Na técnica recomendada por Griswold e col. (1986), trinta minutos após a injeção *iv* de azul de Evans, o animal é sacrificado, o corante é extraído de suas patas posteriores e sua concentração medida por espectrofotometria (Ver Materiais e Métodos). Embora nesta metodologia se compare as concentrações de azul de Evans extraído das duas patas posteriores de um mesmo animal - uma injetada com salina e, a outra, com o estímulo lesivo (SEB, no nosso caso) - o que estamos medindo é a quantidade total de azul de Evans em cada pata, ou seja, a soma do que está nos vasos e do que foi extravasado para os tecidos. Portanto, para se medir exsudação usando-se técnicas como esta, teríamos que admitir a existência de uma rede vascular idêntica nas duas patas do animal, fato este, pouco provável. Para contornar este tipo de problema existem técnicas, nas quais, o

animal antes de ser sacrificado é perfundido com salina para remover a "contaminação" de azul de Evans nos vasos.

Uma explicação semelhante a esta poderia ser usada no caso de outros dados ilustrados na Figura 4 e 6; assim, podemos observar na Figura 4 que o BW 755C e o BW A4C inibiram significativamente o edema mas, embora exista uma tendência da exsudação ser inibida, isto não se mostrou estatisticamente significativo. Fato idêntico pode ser observado na Figura 6 em relação a dose mais alta (4 mg/kg) de DPH utilizada.

Embora o aumento de permeabilidade vascular com exsudação de proteínas, seja o sinal característico do edema inflamatório (Robbins, 1989), nem sempre existe este paralelismo entre o desenvolvimento do edema e da exsudação; assim, acontece frequentemente que, no edema de duração maior do que 48 h, não é a exsudação mas a infiltração celular persistente, o principal componente do edema; este é o caso, por exemplo, do edema tardio produzido por carragenina em camundongos onde há um predomínio de uma reação celular granulomatosa (Henriques e col., 1987). Nossos experimentos, usando-se carragenina como controle-positivo (ver Figura 3), confirmam o trabalho desses autores, pois mostram que 48 h após o estímulo com carragenina, embora a exsudação tenha praticamente desaparecido, o edema se manteve no ápice. Contudo, no estudo que fizemos sobre a variação temporal do edema e da exsudação produzidos pela SEB, este paralelismo entre os dois fenômenos se manteve mesmo após 48 h (Figura 3) sugerindo que no edema tardio induzido pela toxina existe ainda uma predominância de fenômenos vasculares sendo a infiltração celular, provavelmente, um componente pouco relevante.

De acordo com Robbins (1989), no processo inflamatório existem basicamente tres tipos de aumento de permeabilidade vascular com exsudação protêica:

1. Imediato e efêmero: ele começa logo após o estímulo lesivo, atinge seu máximo 5 - 10 min após e desaparece dentro de 15 - 30 min. A exsudação protéica ocorre, porque as células endoteliais das vênulas se contraem formando espaços entre elas ("gaps"); o endotélio capilar não é afetado e, a histamina, é um dos mediadores envolvidos. Este tipo de exsudação ocorre por exemplo, em queimaduras leves.

2. Retardado e prolongado: o exemplo típico deste tipo de exsudação, é o que acontece na queimadura por exposição ao sol que, como se sabe, só se manifesta várias horas após a pessoa ter sido exposta aos raios solares. As vênulas e os capilares são afetados , mas não há formação de "gaps", nem necrose endotelial.

3. Imediato e prolongado; o fenômeno começa logo após o estímulo lesivo, mantém-se intenso por várias horas e só desaparece dentro de vários dias quando, os vasos lesados, são trombosados e cicatrizados. Além das vênulas, os capilares e as arteríolas são também atingidas. As células endoteliais são lesadas severamente e se necrosam. Frequentemente, essas células se descamam e as plaquetas se aderem ao endotélio. O mecanismo para esta exsudação, parece ser uma lesão celular direta pelo próprio estímulo lesivo. O exemplo clássico, é o aumento de permeabilidade vascular que ocorre após queimaduras severas.

Nossos dados mostraram que o edema de pata induzido pela SEB tem longa duração e se inicia, provavelmente, logo após o estímulo lesivo. Portanto, considerando-se o exposto acima, podemos dizer que o edema que a SEB produziu no camundongo envolve uma exsudação do tipo imediata e prolongada onde, de acordo com Robbins 1989), existe lesão endotelial. É interessante observar que a administração *iv* de SEB à macacos, produz necrose das células endoteliais dos capilares do pulmão, sugerindo que o endotélio vascular é um

dos alvos da ação desta toxina (Beisel, 1972).

As células endoteliais vasculares - originalmente consideradas como células de revestimento passivas - representam um papel ativo na inflamação. Elas além de sintetizar PAF e IL-1, liberam vasodilatadores como a prostaciclina e o EDRF e vasoconstritores como a endotelina (Rang e Dale, 1991).

O PAF (1-O-alkil-2-O-acetil-SN-glicero-3-fosforilcolina), produz, além de vasodilatação local, aumento de permeabilidade vascular. Ele está envolvido nos edemas de pata produzidos pela carragenina no rato e no camundongo (Henriques e col., 1990; Hwang e col., 1986; Vargaftig e Ferreira, 1981). Nós mostramos que o pré-tratamento de camundongos com o antagonista de PAF WEB 2086 bloqueou o aumento de permeabilidade vascular e o edema precoce produzidos por SEB (Figura 6). Embora se questione o fato do WEB 2086, agir como um antagonista de PAF no camundongo, porque esta droga é incapaz de inibir o edema tardio (48 - 72h) que a carragenina produz neste animal, não existem dúvidas quanto a inibição que ele produz na primeira fase (1 - 4 h) deste edema (Henriques e col., 1990); nós também confirmamos este fato, ao usarmos carragenina como controle-positivo de nossos experimentos (sem pré-tratamento: peso da pata em mg,  $101.6 \pm 3,80$ ; exsudação de azul de Evans em ug/g,  $3,32 \pm 0,30$ ; com WEB 2086: peso da pata em mg,  $80 \pm 2,74^*$ ; exsudação de azul de Evans em ug/g,  $0,62 \pm 0,14^*$ ).

Vários dos efeitos produzidos por SEB em macacos, se assemelham muito aos da endotoxina (Bergdoll, 1983; Bergdoll e Chesney, 1991). O WEB 2086 inibe no rato, de um modo dose-dependente, a hipotensão e o efeito letal do PAF e da endotoxina (Casals - Stenzel, 1987). Portanto, nossos resultados mostrando que esta droga inibiu o edema de pata precoce produzido pela SEB em camundongos, não só sugerem um envolvimento do PAF neste edema, como também, indicam uma outra semelhança entre os efeitos da SEB no

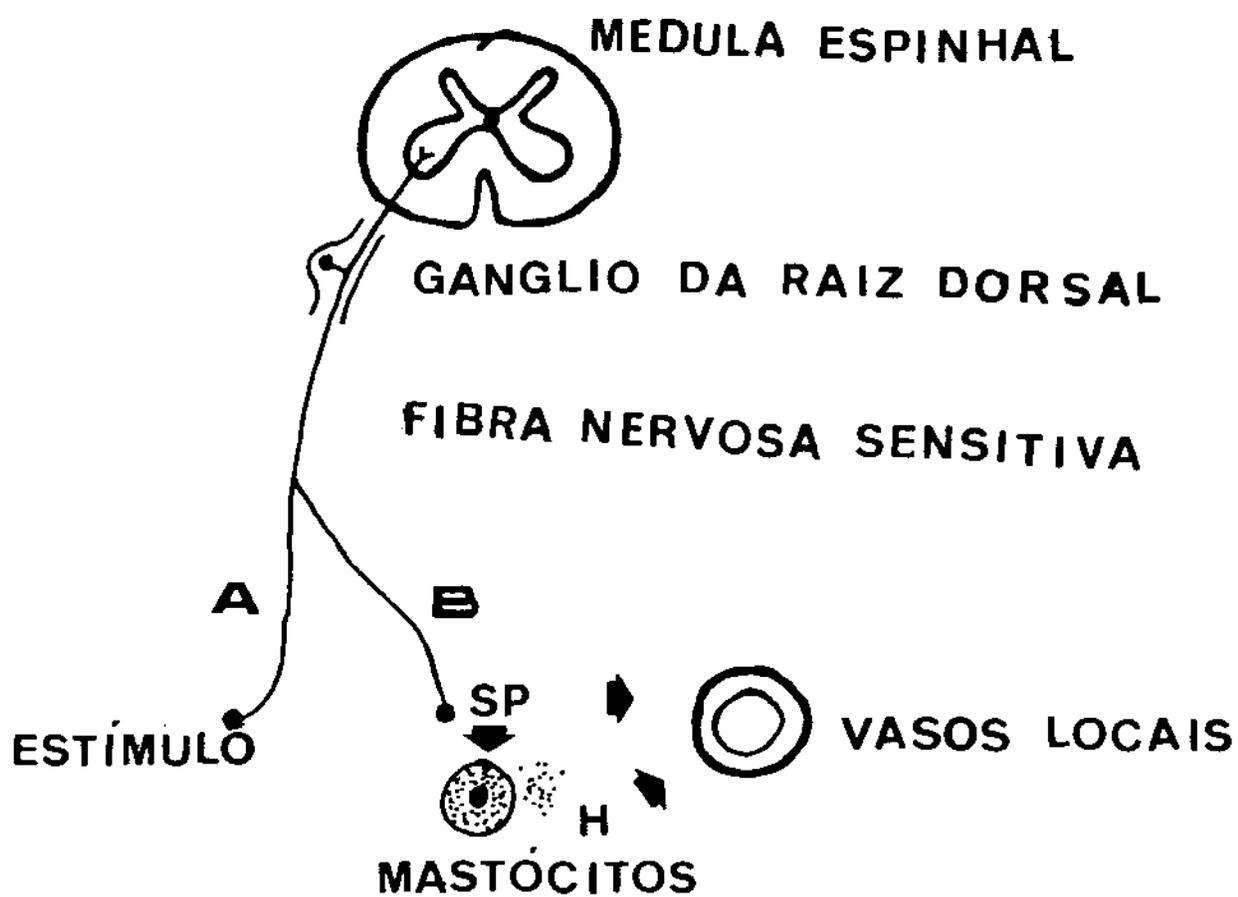
macaco e no camundongo. Os efeitos inflamatórios do PAF no rato são, em parte, mediados indiretamente por liberação de produtos da CO (Vargaftig e Ferreira, 1981); nossos dados porém, mostraram que o edema precoce induzido por SEB, não foi inibido por INDO (Figura 4). No entanto, isto não invalida nossa hipótese de um possível envolvimento do PAF no edema produzido por esta enterotoxina no camundongo, pois o modelo inflamatório neste animal difere daquele do rato em vários aspectos (Henriques e col., 1987; Jacobson e Jacobs, 1992; Levy, 1969).

As alterações hematológicas induzidas pela SEB em macacos são bifásicas; inicialmente, há leucocitose neutrofílica com linfopenia e, posteriormente, linfocitose com predominância de células imaturas e muito ativas (Crawley, 1966; Sugiyama e Mickissic Jr, 1966; Zchavi-Willner e col., 1984). O vômito e a diarreia, os principais sintomas clínicos tanto da intoxicação alimentar, como da enterotoxemia experimental por SEs, têm curta duração e persistem no máximo por 24 h (Beisel, 1976; Bergdoll, 1970). A neutrofilia produzida pelas SEs dura cerca de 28 h (Sugiyama e Mckissic Jr., 1966), enquanto a linfocitose é mais persistente e, está presente, mesmo após o desaparecimento de todos os sintomas clínicos; esta alteração hematológica, parece ser mais representativa das alterações imunológicas e da imunossupressão produzida por essas toxinas (Zechavi-Willner e col., 1984).

O edema induzido pela SEB também manifestou - se de um modo bifásico (ver Figura 3). Por outro lado, nossos experimentos com inibidores da metabolização do AA (Figuras 4 e 5), mostraram o envolvimento de mediadores diferentes nas duas fases do edema. Assim, embora tanto o edema precoce como o edema tardio, tenham sido inibidos por DEXA e BW 755C, o pré-tratamento com INDO inibiu somente o edema tardio e não afetou significativamente o edema precoce que, por sua vez foi bloqueado pelo BW

A4C, um inibidor da LO do AA. Como os cisteinil-leucotrienos são produzidos pela LO do AA e, estão envolvidos nas enterotoxemias induzidas por SEs (Sheuber e col., 1987; Denzlinger e col., 1986), poder-se-ia admitir que o edema precoce produzido pela SEB, está mais correlacionado com a enterotoxemia propriamente dita, enquanto o edema tardio, é mais um reflexo das alterações imunológicas induzidas pela toxina. Por outro lado, além do pré-tratamento com INDO ter se mostrado ineficaz para bloquear o edema e a exsudação precoces que a SEB produziu em camundongos, este pré-tratamento resultou, até mesmo, em uma tendência a potenciação destes dois eventos (Ver Figura 4 ). Este fato, pode reforçar nossa suposição (já sugerida também pela inibição do edema pelo BW A4C) da participação de produtos da LO do AA na fase precoce do edema pois, com a inibição da CO pela INDO, a LO do AA seria favorecida.

Como já foi mencionado anteriormente, a SP está envolvida na " pseudo-alergia" cutânea que a SEB produz em macacos não sensibilizados (Alber e col., 1989). A SP é um dos neuropeptídeos presentes nas chamadas fibras C do nervo sensorial; ela é considerada como principal mediador das inflamações neurogênicas. O envolvimento dos nervos sensoriais na inflamação neurogênica é feito por um reflexo axonal e, através deste reflexo, são envolvidos os mastócitos. O esquema sugerido por Celandier e Folkow (1953) e, que estamos reproduzindo na Figura 8, pode explicar de uma maneira mais didática a participação da SP e dos mastócitos na inflamação neurogênica. Como mostra esta Figura, a estimulação lesiva de um terminal periférico **A** de uma fibra nervosa sensorial produz a liberação de SP através de um outro terminal periférico **B** da mesma fibra. A SP, por sua vez, tanto age nos vasos locais, como libera histamina dos mastócitos da região, histamina esta que, também vai agir sobre estes mesmos vasos (Foreman, 1987). Em resumo, a



**Figura 8** - Modelo de reflexo axonal na inflamação neurônica ( Celandier e Folkow, 1953).

liberação de histamina de mastócitos neste tipo de inflamação não ocorre diretamente pelo estímulo lesivo e sim, indiretamente via SP.

A CPS (trans - 8 - metil - N - vanilil - 6 - nonamida) é uma substância capaz de depletar as fibras C dos nervos sensitivos do seu conteúdo de neuropeptídeos, o que inclui a SP (Foreman, 1987). Nossos resultados mostrando que a CPS inibiu tanto o edema como a exsudação induzida por SEB ( Figura 7), sugerem que esses dois eventos fazem parte de uma inflamação neurogênica provocada pela toxina. Isto também é sugerido pelo envolvimento da histamina no processo, pois o pré-tratamento dos animais tanto com antagonista do tipo H<sub>1</sub>, como H<sub>2</sub> de histamina, inibiram significativamente o edema e a exsudação produzidos pela SEB (Figura 6). Dentro do contexto da SEB promover uma inflamação neurogênica é oportuno lembrar que, como já dissemos (Ver Introdução pg 2), as SEs são neurotoxinas. Por outro lado, temos dados preliminares e ainda não publicado ( Souza e Ribeiro-DaSilva), mostrando que, a incubação de SEB *in vitro* com mastócitos peritoneais de ratos ou de camundongos não produz liberação de histamina destas células. O fato da SEB não ser um estímulo direto para liberar *in vitro* histamina de mastócitos mas, produzir *in vivo* um processo inflamatório envolvendo histamina, como mostraram nossos resultados nesta Tese, reforçam muito a idéia de que esta toxina produz realmente uma inflamação neurogênica.

Analisando-se o conjunto de resultados que obtivemos na caracterização do edema de pata induzido pela SEB em camundongos verificamos que, tanto este edema como o vômito e a "pseudo-alergia" cutânea que a SEB produz no macaco, possuem alguns mediadores comuns pois, todos esses efeitos da toxina envolvem os receptores histamínicos H<sub>2</sub> e os produtos da LO do AA. Por outro lado, a SP que está envolvida na "pseudo-alergia" cutânea que a SEB produz no macaco, muito provavelmente, é um dos neuropeptídeos envolvidos

no edema de pata que a toxina produziu no camundongo.

Como conclusão, estes paralelismos que apontamos acima entre os efeitos da SEB no macaco - considerado como modelo animal para o estudo da toxina - e, o edema de pata que descrevemos no camundongo indicam que, se este assunto for melhor esclarecido, o camundongo poderia vir a substituir vantajosamente o macaco, na elucidação do mecanismo de ação *in vivo* das SEs.

## 6. CONCLUSÕES

Nossos resultados usando como modelo experimental o edema de pata induzido pela SEB em camundongos, indicam que, se este assunto for melhor esclarecido, este animal poderia vir a substituir vantajosamente o macaco, na elucidação do mecanismo de ação *in vivo* das SEs.

## 7. RESUMO

1. A SEB produziu na pata de camundongos um edema de longa duração, dose e tempo-dependente.
2. Este edema foi bifásico; a primeira fase (edema precoce) durou aproximadamente 24 h , enquanto que a segunda fase (edema tardio), iniciou-se nas 24 h e se prolongou por mais 72 h.
3. Houve um paralelismo entre o edema e a exsudação de azul de Evans produzidos pela SEB, sugerindo ser a exsudação o componente principal deste edema.
4. Os metabólitos do ácido araquidônico parecem ser mediadores do edema de pata induzido pela SEB em camundongos; os produtos da lipoxigenase estão envolvidos no edema precoce e os da ciclooxigenase, no edema tardio.
5. O edema precoce produzido pela SEB, foi parcialmente bloqueado em camundongos previamente tratados com metissergida, ou com WEB 2086, um antagonista de PAF.
6. A depleção dos neuropeptídeos de fibras C sensoriais com capsaicina, inibiu o edema precoce produzido pela SEB.
7. O pré-tratamento dos animais com antagonistas histamínicos, tanto H<sub>1</sub> como H<sub>2</sub>, bloqueou o edema e a exsudação induzidos por SEB.

8. Devido a vários paralelismos observados entre o edema de pata induzido pela SEB no camundongo, o vômito e a "pseudo-alergia" cutânea que a toxina produz no macaco, nossos resultados sugerem que, o edema de pata produzido pela SEB no camundongo, poderia ser usado como um modelo experimental para o estudo *in vivo* das enterotoxemias por SEs

## 8. SUMMARY

1. Staphylococcal enterotoxin B (SEB) induces a long-lasting, dose- and time-dependent edema in the mouse hind paw.
2. The edematogenic response was biphasic and consisted of a primary (early) phase which lasted approximately 24 h and a secondary (late) phase which started after 24 h and continued for up to 72 h.
3. There was a positive correlation between the measured edema and the amount of Evans blue extravasation produced by SEB, suggesting that this exudate is the principal component of the edema.
4. Arachidonic acid metabolites appear to be involved in the SEB-induced edema: lipoxygenase products are involved in the early phase while cyclooxygenase products are involved in the late phase.
5. The early phase edema was partially prevented by pretreatment of the mice with either methysergide or with the PAF antagonist WEB 2086.
6. Pretreatment of mice with capsaicin to deplete the sensory C-fibers of their neuropeptides inhibited the early edema induced by SEB.
7. Pretreatment with H1 and H2 histamine receptor antagonists also inhibited the early phase edema and the accompanying Evans blue extravasation induced by SEB.

8. Based on the similarities between the SEB-induced edema in mice and the vomiting and cutaneous 'pseudoallergy' produced by this toxin in monkeys, our results suggest that mice may prove to be a useful model for studying SE-mediated enterotoxemia.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBER, G.; SCHEUBER, H. P.; RECK, B.; SAILER-KRAMER, B. HARTMANN, A.; HAMMER, D.K. Role of substance P immediate- type skin reactions induced by staphylococcal enterotoxin B in unsensitized monkeys. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 84: 880 -885, 1989.
- ANTUNES, E.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; PRADO-FRANCESCHI, J. Cross-neutralization of the histamine-releasing activity of snake venoms. *Acta Physiol. Pharmacol. Ther. Latinoam.*, 39: 431 - 438, 1989.
- BAMBERGER, U.; SCHEUBER, P. H.; SAILER-KRAMER, B.; BARTSCH, K.; HARTMANN, A.; BECK, G.; HAMMER, D.K. Anti-idiotypic antibodies that inhibit immediate-type skin reactions in unsensitized monkeys upon challenge with staphylococcal enterotoxin. *Proc. Natn. Acad. Sci. USA.*, 83: 7054 - 7058, 1986.
- BEISEL, W. R. Pathophysiology staphylococcal enterotoxin type B (SEB) toxemia after intravenous administration to monkeys. *Toxicon*, 10: 440 - 443, 1972.
- BEISEL, W. R. *Staphylococcus aureus* enterotoxins. In: Trace substance and health. New York, P M Newberne (ed), 1976. Marcel Dekker Inc., p 12 - 27.
- BERGDOLL, M. S. Staphylococcal Enterotoxins, p 265 - 326. In: T C Montie, S Kadis and S J Aji (eds). Academic Press, New York, p 265 - 326, 1970.
- BERGDOLL, M. S. Staphylococcal intoxications. In: Food-born infections and

intoxications. New York, Academic Press (ed), 1979. p 443 - 494.

BERGDOLL, M. S. Enterotoxins. In: Staphylococci and Staphylococcal Infections. 1983. p 559 - 597.

BERGDOLL, M. S. *Staphylococcus aureus*. In: Foodborn Bacterial Pathogens. USA, Maxwell (ed), 1989. p 464 - 513.

BERGDOLL, M. S. & CHESNEY, P. J. Role of antibodies in toxic shock syndrome toxin 1. In: Toxic Shock Syndrome. Boston - USA, CRC Press, 1991. p 75 - 91.

BERTRAND, C.; GEPPETTI, P.; BAKER, J.; YAMAWAKI, I.; WADEL, A. J. Role of neurogenic inflammation in antigen - induced vascular extravasation in guinea pig trachea. *J. Immunol.*, 150: 1479 - 1485, 1993.

BEST, G. K.; ABNEY, T. O.; KLING, J. M.; KIRKLAND, J. J.; SCOTT, D. F. Hormonal influence on experimental infections by a toxic shock syndrome strain of *Staphylococcal aureus*. *Infect. Immun.*, 52: 331 - 345, 1986.

BOBAK, D. A.; GUERRANT, R. L. New developments in enteric bacterial toxins. *Adv. Pharmacol.*, 23: 85 - 101, 1992.

CASALS-STENZEL, J. Protective effect of WEB 2086, a novel antagonist of platelet activating factor, in endotoxin shock. *Eur. J. Pharmacol.*, 135: 117 - 122, 1987.

- CASALS-STENZEL, J.; MUACEVIC, G.; WEBER, K. H. Pharmacological actions of WEB 2086, a new specific antagonist of platelet activating factor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 241: 974 - 981, 1987.
- CELANDER, O.; FOLKOW, B. The nature and the distribution of afferent fibres provided with the axon reflex arrangement. *Acta. Physiol. Scand.*, 29: 359 - 370, 1953.
- CRAWLEY, G. J.; GRAY I.; LEBLANC, W. A.; BLANCHARD, J. W. Blood binding, distribution and excretions of staphylococcal enterotoxins in monkeys. *J. Infect. Dis.*, 116: 48 - 56, 1966.
- CURRY, H. S.; BROWN, A. E. Preparation and stability of indomethacin solutions. *J. Physiol. Pharmacol.*, 60: 988 - 992, 1982.
- DAVIES, P.; BAILEY, P. J.; GOLDENBERG, M. M.; FORD-HUTCHINSON, A. W.. The role of arachidonic acid oxygenation products in pain and inflammation. *Annu. Rev. of Immunol.*, 2: 335 - 354, 1984.
- DE AZAVEDO, J. C. S.; DRUMM, A.; JUPIN, C.; PARANT, M.; ALOUF, J.E.; ARBUTHNOTT, L. P. Induction of tumor necrosis factor by staphylococcal toxin shock toxin 1. *Microbiol. Immunol.*, 47: 69 - 75, 1988.
- DENZLINGER, C.; GUHLMANN, A.; SCHEUBER, H. P.; WILKER, D.; HAMMER, K. D.; KEPPLER, D. Metabolism and analysis of cysteinyl leukotrienes in the monkey. *J. Biol. Chem.*, 261: 15601 - 15606, 1986.

FAST, D. J.; SCHLIEVERT, M. P.; NELSON, D. R. Nonpurulent response to toxic shock syndrome toxin 1-producing *Staphylococcus aureus*. *J. Immunol.*, 140: 949 - 953, 1988.

FLEISCHER, B.; SCHREZENMEIER, H.; CONRADT, P. T cell stimulation by staphylococcal enterotoxins: Role of class II molecules and T cell surface structures. *Cell. Immunol.*, 119: 92 - 101, 1989.

FORD-HUTCHINSON, A. W. Leukotrienes: their formation and role as inflammatory mediators. *Fed. Proc.*, 44: 25 - 29, 1985.

FOREMAN, C. J. Peptides and neurogenic inflammation. *Br. Med. Bull.*, 43: 386 - 400, 1987.

FRANCO, M. F.; MORLEY, J. Use of I-labelled albumin for the detection and measurement of delayed-hypersensitivity reactions in the mouse. *J. Immunol. Methods.*, 11: 7 - 14, 1976.

GARCIA LEME, J.; HAMAMURA, L.; LEITE, M. P.; ROCHA E SILVA, M. Pharmacological analysis of the acute inflammatory process induced in the rat's paw by local injection of carragenan and by heating. *Br. J. Pharmacol.*, 48: 88 - 96, 1973.

GRISWOLD, D. E.; WEBB, E. F.; CLARK, M. A.; MONG, S. Phlogistic activity of leukotriene D<sub>4</sub> in the mouse. *Inflammation.*, 10: 1 - 7, 1986.

GROSSMAN, D.; COOK, G. R.; SPARROW, T. J.; MOLLICK, A. J.; RICH, R. R.

Dissociation of the stimulatory activities of staphylococcal enterotoxins for T cells and monocytes. *J. Exp. Med.*, 172: 1831 - 1841, 1990.

HENDRIX, T. R.; BAYLISS, T. M. Digestion: intestinal secretion. *Annu. Rev. Physiol.*, 32: 139 - 164, 1970.

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

HENRIQUES, M. G. M. O.; WEG, V. B.; MARTINS, M. A.; SILVA, P. M. R.; FERNANDES, P. D.; CORDEIRO, R. S. B.; VARGATIG B. B. Differential inhibition by two hexazepine PAF antagonists of acute inflammation in the mouse. *Br. J. Pharmacol.*, 99: 164 - 168, 1990.

HWANG, S. B.; LAM, M.; LING, C.; SHEN, T. Release of platelet activating factor and its involvement in the first phase of carrageenin-induced in rat foot edema. *Eur. J. Pharmacol.*, 120: 33 - 41, 1986.

IANDOLO, J. J. Genetic analysis of extracellular toxins of *Staphylococcus aureus*. *Annu. Rev. Microbiol.*, 43: 375 - 402, 1989.

JACOBSON, P. B.; JACOBS, R. S. Fuscocide: An anti-inflammatory marine natural product which selectively inhibits 5-lipoxygenase. Part I: Physiological and biochemical studies in murine inflammatory models. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 262: 866 - 873, 1992.

JUPIN, C.; ANDERSON, S.; DAMAIS, C.; ALOUF, J. E.; PARANT, M. Toxic shock syndrome toxin 1 as an inducer of human tumor necrosis factors and alfa interferon. *J. Exp. Med.*, 167: 752 - 761, 1988.

KAPRAL, F. A.; O BRIEN, A. D.; RUFF, P. D.; DRUGAN, W. J. Inhibition of water absorption in the intestine by *Staphylococcus aureus*, delta-toxin. *Infect. Immun.*, 13: 140 - 145, 1976.

KOUPAL, A.; DEIBEL, R. H. Rabbit intestinal fluid accumulation by an enterotoxigenic factor of *Staphylococcal aureus*. *Infect. Immun.*, 18: 298 - 303, 1977.

LANGFORD, M. P.; STANTON, G. J.; JOHNSON, H. M. Biological effects of staphylococcal enterotoxin A on human peripheral lymphocytes. *Infect. Immun.*, 22: 62 - 68, 1978.

LEVINE, M. M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: Enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. *J. Infect. Dis.*, 155: 337 - 389, 1987.

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

LOWELL WINE, R. Analysis of variance - one-way classification. In: *Statistics for scientists & engineers*. USA, Prentice-Hall of India (Private) LTd (ed), 1966. p 311 - 365.

- PARSONNET, J.; HICKMAN, R. K.; EARDIEY, D.D. Induction of human interleukin - 1 by toxic shock syndrome toxin 1. *J. Infect. Dis.*, 151: 514 - 522, 1985.
- PEAVY, O. L.; ALDIER, W. H.; SMITH, R. T. The mitogenic effects of endotoxin and staphylococcal enterotoxin B on mouse spleen cells and human peripheral lymphocytes. *J. Immunol.*, 106: 1453 - 1458, 1970.
- RANDALL, R. W.; EAKINS, K. W.; HIGGS, G. A.; SALMON, J. A.; TATESON, J. E. Inhibition of arachidonic acid cyclooxygenase and lipoxygenase of leukocytes by indomethacin and compound BW 755 C. *Agents actions.*, 10: 553 - 555, 1980.
- RANG E DALE, M.M. Hormônios locais, inflamação e alergia. In: *Farmacologia*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan SA (ed), 1993. p 152 - 174.
- ROBBINS, S.L.; COTRAN, R. S.; KUMAR, W. INflammation and repair. In: *Pathologic Basis of Disease*. Phyladelphia USA, Int Edition, 1989. p 33 - 72.
- ROTHSCHILD, A. M. Histamine release by bee venom phospholipase A and mellitin in the rat. *Br. J. Pharmacol.*, 25: 59 - 66, 1965.
- SAMUELSON, B. Leukotrienes: Mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science.*, 220: 568 - 575, 1983.
- SCHANTZ, E. J.; ROESSLER, W. G.; WAGMAN, J.; SPERO, L.; DUNNERYD, A.; BERGDOLL, M. S. Purification of staphylococcal enterotoxin B .

*Biochemistry*, 4: 1011 - 1016, 1965.

SCHEUBER, P. H.; DENZILINGER, C.; WILKER, D.; BECK, G.; KEPPLER, D.; HAMMER, D. K. Cysteinyl leukotrienes as mediators of staphylococcal enterotoxin B in monkey. *Eur. J. Clin. Invest.*, 17: 455 - 459, 1987.

SCHEUBER, P. H.; DENZILINGER, C.; WILKER, D.; BECK, G.; KEPPLER, D.; HAMMER, D. K. Staphylococcal enterotoxin B as a noimmunological mast cell stimulus in primates: The role of endogenous cysteinyl leukotrienes. *Int. Arch. Allergy. Immunol.*, 82: 289 - 291, 1987.

SCHEUBER, P. H.; GOLECKI, R. J.; KICKHOFEN, B.; SCHEEL, D.; BECK, G.; HAMMER, D. K. Skin reactivity of unsensitized monkeys upon challenge with staphylococcal enterotoxin B: A new approach for investigating the site of toxin action. *Infect. Immun.*, 50: 869 - 876, 1985.

SCHLANGER, T. A.; GUERRANT, R. L. Seven possible mechanisms for *Escherichia coli* diarrhea. *Infect. Dis. Clin. North. Am.*, 2: 607 - 624, 1988.

SHEMANO, I.; HITCHENS, J.; BEILER, J. M. Paradoxical intestinal inhibitory effects of staphylococcal enterotoxin. *Gastroenterology*, 53: 71 - 77, 1967.

SIEGEL, S. In: *Estatística não paramétrica*. Rio de Janeiro, McGraw-Hill do Brasil-LTDA (ed). 1979. p 302 - 305.

SMITH, B. G.; JOHNSON, H. M.; The effect of staphylococcal enterotoxins on the primary *in vitro* immune response. *J. Immunol.*, 115: 575 - 578, 1975.

SPERO, L.; STEFANYE, D.; BRECHER, P. I.; JACOBY, H. M.; DALIDOWIEZ, J. E.; SCHANTZ, J. E. Amino acid composition and terminal amino acids of staphylococcal enterotoxin B. *Biochemistry*, 4: 1024 - 1030, 1965.

SUGIYAMA, H.; MCKISSIC, E. M. Leucocytic with staphylococcal enterotoxin. *J. Bacteriol.*, 92: 349 - 352, 1966.

SULLIVAN, R.; ASANO, T. Effects of Staphylococcal enterotoxin B on intestinal transport in the rat. *Am. J. Physiol.*, 220: 1793 - 1797, 1971.

TATESON, J. E.; RANDALL, R. W.; REYNOLDS, C. H.; JACKSON, W. P.; BHATTACHERJEE, P.; SLMON, J. A.; GARLAND, L. G. Selective inhibition of arachidonate 5 - lipoxygenase by novel acetohydroxamic acids: biochemical assessment *in vitro* and *ex vivo*. *Br. J. Pharmacol.*, 94: 528 - 538, 1988.

VAN MIERT, A. S. J. P. A. M.; VAN DUIN, C. T. M.; SCHOTMAN, A. J. H. Comparative observations of fever and associated clinical hematological and blood biochemical changes after intravenous administration of staphylococcal enterotoxin B and F 9(toxic shock syndrome toxin-1) in goats. *Infect. Immun.*, 46: 354 - 360, 1984

VARGAFTIG, B. B.; FERRERA, S. H. Blockade of the inflammatory effects of platelet-activating factor by cyclo-oxygenase inhibitors. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 14: 187 - 189, 1981.

WAGMAN, J.; RICHARD, C. E.; SCHANTZ, E. J. Molecular size, homogeneity, and hydrodynamic properties of purified Staphylococcal enterotoxin B. *Biochemistry*, 4: 1017 - 1023., 1965.

YOUNG, J. M.; DOREEN, A.; SPIRES, M. S.; BEDORD, J. C. Wagner B, Ballaron S J, and De Yong M L (1984). The mouse ear inflammatory response to topical arachidonic acid. *J. Invest. Dermatol.*, 82: 367 - 371.

YOUNG, J. M. SPIRES, D. A. BEDORD, C. J.; WAGNER, B.; BALLARON, S. J.; DE YOUNG, L. M. Mouse ear inflammatory response to topical arachidonic acid. *Journal of Investigative Dermatology.*, 43: 48 - 52, 1984.

ZEHAVI-WILLNER, T.; SHENBERG, E.; BARNES, A. *In vivo* effect of staphylococcal enterotoxin A on peripheral blood lymphocytes. *Infect. Immun.*, 44: 401 - 405, 1984.

AS REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS FORAM ORGANIZADAS DE ACORDO COM A ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT) - NBR 6023, AGOSTO, 1989.