

GLAUCE APARECIDA PINTO VALBERT DE CASTRO *vt*

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pela aluna Glauce Aparecida Pinto Valbert de Castro, e aprovada pela Comissão Julgadora, em 23 de abril de 1986.

*M. Ant. Queiroz*

ESTUDO EXPERIMENTAL DO EDEMA E DA CONTRA-IRRITAÇÃO PRODUZIDOS  
PELA CARRAGEENINA EM RATOS.

*in Base*

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de MESTRE em Biologia na área de Fisiologia e Biofísica.

Orientador: Prof. Dr. URBANO MORATO FERRAZ MEIRELLES *Ferraz*

CAMPINAS

-1986-

*Dedico*  
*aos meus pais e*  
*ao meu marido.*

## INDICE

	Pg.
I. INTRODUÇÃO .....	01
Inflamação-Geral .....	01
Generalidades sobre Carrageenina .....	06
Contra-Irritação .....	13
Proposição .....	17
II. MATERIAL E MÉTODOS .....	18
Material: A. Animal .....	18
B. Medidor .....	18
C. Drogas .....	19
Métodos: A. Preparo dos Animais .....	19
B. Preparo das Soluções e Suspensões .....	20
C. Esquemas de Tratamento .....	21
D. Adrenalectomia .....	21
E. Imobilização .....	22
F. Produção e Medidas do Edema .....	22
G. Coleta de Fluido do Edema .....	24
H. Elaboração dos Resultados .....	24
I. Apresentação dos Resultados .....	24
III. RESULTADOS .....	26
IV. DISCUSSÃO .....	64
V. CONCLUSÕES .....	80
VI. SUMMARY .....	81
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	82

INTRODUÇÃO

## INTRODUÇÃO

### I. INFLAMAÇÃO-GERAL

Atribue-se a John Hunter (1794) a concepção do processo inflamatório como reação do organismo à agressão, corrigindo a idéia dominante na época de considerá-lo como uma entidade mórbida em si própria. Como a maioria dos conceitos fundamentais da patologia, a inflamação é difícil de ser definida (Spector & Willoughby, 1963).

Sendo um conjunto de mecanismos de defesa contra agentes agressivos, genericamente chamados flogógenos, de natureza química, física ou biológica, a inflamação objetiva neutralizar, destruir e eliminar esses agentes, restaurando, idealmente, a estrutura e função modificadas.

A consequência inicial do estímulo eficaz pelos flogógenos em determinada região envolve necessariamente a microcirculação e, a seguir, os tecidos circunvizinhos sendo, a reação em geral, pouco específica. Assim, observa-se mudança do calibre e da velocidade do fluxo sanguíneo, aumento de permeabilidade vascular e efluxo de um exsudato rico em proteínas que se coleta no interstício, de onde é removido principalmente por via linfática, cujo fluxo também aumenta, nas áreas de reação.

Segue-se um conjunto de eventos cuja característica maior é a migração de células para a área atingida, principalmente leucócitos circulantes, acompanhados de maior

ou menor número de hemácias, em função do tipo e intensidade do estímulo.

O sucesso da resolução completa depende portanto, não só da natureza do flogógeno, como também de sua estabilidade química e da persistência de sua ação. A supuração, ou uma reação granulomatosa crônica são as consequências mais comuns da ação persistente do agente agressivo.

Dentre os primeiros eventos reacionais dos tecidos a ação de agentes inflamatórios está uma fugaz vasoconstricção, considerada importante somente nas lesões térmicas ou mecânicas sobre a pele, (Allison e cols, 1955). Segue-se uma dilatação de arteríolas e vênulas, a abertura de numerosos vasos de microcirculação os quais, quando quiescentes, permanecem colabados, mas que sob estímulos, podem até decuplicar o fluxo sanguíneo na área de reação. Nesse estágio, o fluxo é ainda rápido e unidirecional sendo, algumas horas depois, sucedido por redução da velocidade, estando ainda os vasos dilatados, ocasião em que se desfaz a disposição axial ou laminar de fluxo dos componentes sanguíneos, com marginação de células. Essas condições facilitam a incidência de leucócitos contra as paredes principalmente venulares, de modo que, se suficiente a lesão vascular, estas células momentaneamente aderem ao endotélio, eventualmente transferindo-se, por diapedese, ao interstício. A vasodilatação, conquanto facilite, não é a responsável pelo escape de proteínas circulantes, havendo circunstâncias, como no exercício físico, em que da microcirculação se dilatam amplamente, sem que ocorra extravasamento anormal. À medida em que se acumula líquido no interstício, o conseqüente aumento de

pressão pode-se transformar em fator importante do fluxo sanguíneo (Hurley, 1978). No edema de natureza inflamatória o efluxo de proteína plasmática do compartimento vascular só ocorre através das aberturas ou "gaps", formadas a partir do encurtamento de proteínas contráteis no citoplasma das células endoteliais de modo a alargar os espaços juncionais entre endoteliócitos adjacentes, em alguns segmentos vasculares. Essas proteínas, semelhantes à actomiosina foram identificadas em muitos tipos de células, incluindo as endoteliais, desde a aorta até capilares (Majno e cols., 1969). Tanto a histamina (H) como a serotonina (5-HT) ou a bradicinina (BDK) produzem efluxo venular de proteínas plasmáticas e até a nível de pequenas veias de 12-80  $\mu\text{m}$  de diâmetro, embora, nenhum desses autacóides pareça exercer essa ação sobre capilares verdadeiros, isto é, aqueles de 5-6  $\mu\text{m}$  de diâmetro.

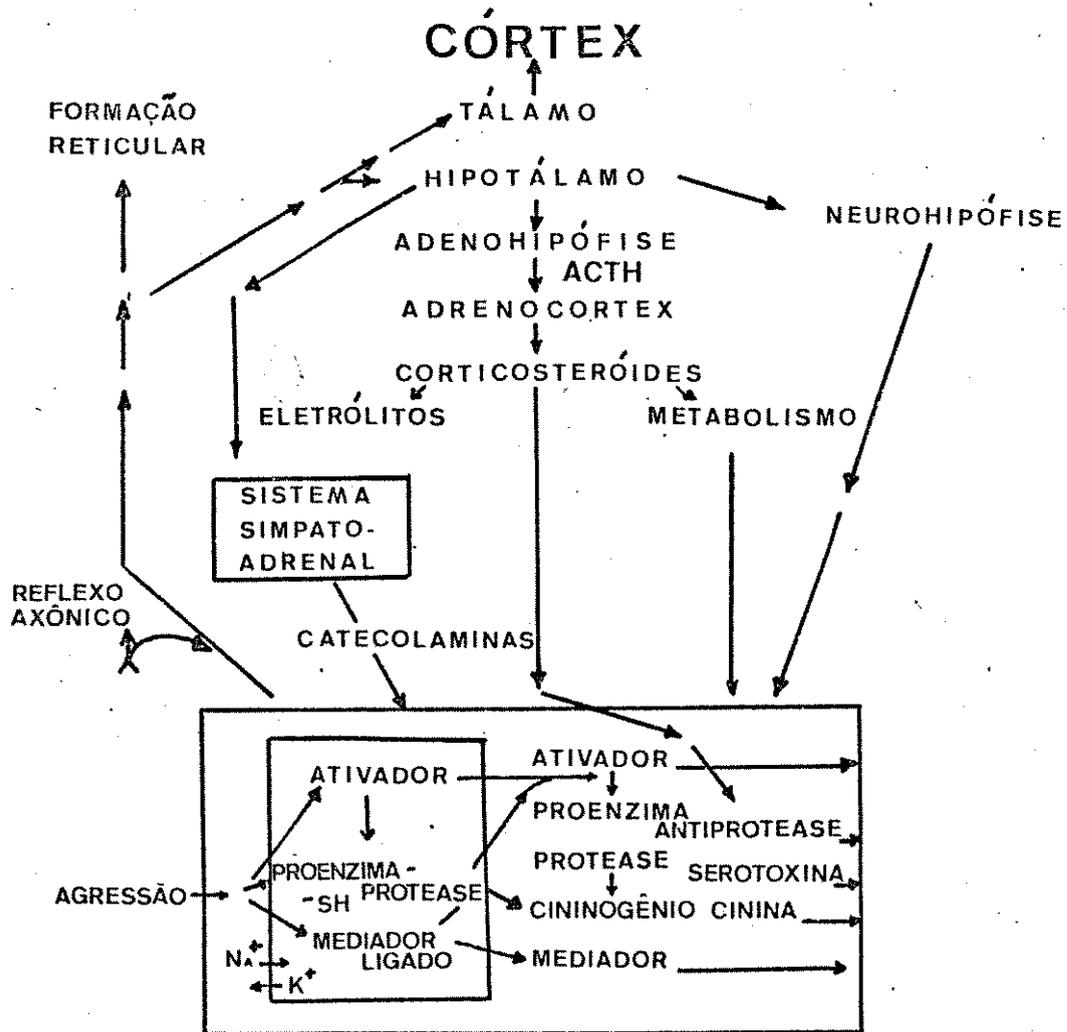
Não há explicação plausível para a presença seletiva dos "gaps" nos segmentos venulares da microcirculação. A causa primeira do efluxo de líquido vascular é complexa. Este, em certos tipos de lesão, incia-se imediatamente, sugerindo ação direta sobre os microvasos. Na inflamação pleural produzida pela terebintina ou no edema de pata produzido pela carrageenina o efluxo se limita à área venular (Hurley & Spector, 1965; Hurley & Willoughby, 1973) enquanto que nas lesões térmicas moderadas e nas provocadas por raio X também são atingidos segmentos capilares. A estimulação direta pode ser responsável pela exsudação que ocorre imediatamente após a lesão, mas não explica os efluxos que se iniciam semanas horas ou mesmo dias depois da lesão, sugerindo fortemen-

te a existência de etapas intermediárias.

A reabsorção das moléculas de proteína do exsudato se faz essencialmente por via linfática. Os linfáticos capilares que comumente se apresentam colapsados, têm estrutura semelhante aos capilares sanguíneos, entretanto com o endotélio mais fino e mais irregular, com membranas basal tênue e, frequentemente ausente, existindo espaços ("gaps") mesmo em condições normais (Casley-Smith & Florey, 1961). Da superfície externa dos linfáticos terminais emergem delicadas fibrilas que são unidas a várias fibras conjuntivas dos tecidos adjacentes, de modo que quando se aumenta o fluído no interstício esses "filamentos de ancoragem" na acepção de Leak & Burke (1968), exercem tração sobre as paredes linfáticas e, conseqüentemente, provocam sua dilatação, distendendo-os, aumentando o número dos espaços intercelulares endoteliais. Uma vez no interior dos capilares linfáticos o líquido e a proteína extravasculares passam aos linfáticos coletores passivamente, com auxílio de pressão positiva dos tecidos circunjacentes, ação de válvulas e, em alguns casos, ajudados também pelas variações de pressão intratorácica, uma vez que não se conhece a participação da contração de paredes dos vasos linfáticos, no homem.

Ungar (1969) analisou a inflamação, partindo de agressões de mínima intensidade e duração, e o gradual recrutamento dos numerosos e complexos mecanismos orgânicos solicitados para cumprir o objetivo final de neutralização, eliminação e restauração das condições morfo-funcionais de normalidade. Tipicamente, afirma, a inflamação é processo auto-limitado, o que se atribui à intervenção de inibidores do

sistema de proteases e de enzimas, como por exemplo cininas que põem fim à ação de proteases e seus produtos. Quando o estímulo é de suficiente intensidade e duração o complexo sistema operativo pode ser esquematizado do seguinte modo:



Esquema 1: Controle do processo inflamatório pelo sistema neuro-endócrino.

O retângulo na parte inferior representa alguns componentes do foco inflamatório. O estímulo agressivo ativa a liberação celular de  $K^+$  e a penetração de  $Na^+$ , a ação de proteases e a modificação da conformação de proteínas celulares, com desorganização celular e liberação de ativadores, enzimas e substâncias ativas antes ligadas a proteína (Ungar, 1966).

Uma apreciação extensa dos mecanismos neurais e endócrinos envolvidos na reação inflamatória foi publicada por Garcia Leme em 1981, com análise da participação da insulina como pró-inflamãgeno, ação anti-inflamatória do glucagon e envolvimento de sistemas neuro-sensoriais.

## II. GENERALIDADES SOBRE A CARRAGEENINA

Dentre as substâncias mais utilizadas para o estudo da inflamação experimental e para análise de drogas potencialmente anti-inflamatórias está a carrageenina (CRRG) usada pela primeira vez por Robertson & Schwartz (1953).

A principal fonte de CRRG é *Chondrus crispus*, alga também conhecida como carrageenina, musgo irlandês, musgo de Carragheen, nome do local onde cresce em abundância, nas costas da Irlanda, região de Waterford. O extrato da alga *Chondrus crispus* foi pela primeira vez chamado de carrageenina por Stanford em 1862, (citado por Di Rosa, 1972). O termo carrageenana é mais recente, e usado por vários autores a partir de 1950. Embora *Chondrus crispus* seja a principal fonte de carrageenina, Di Rosa (1972), relata que material de composição semelhante e propriedades físicas análogas foi também obtido de *Gigartina Stellata*, *Hypnea musciformis*, *Rhodymenia palmata*, *Gracilaria confervoides*, *Eucheuma spinosum*, *Furcellaria festigiata*, *Gigartina acicularis*, *Gigartina pistillata*, *Gigartina radula*, *Polydes rotundus* e *Gigartina ceptorhyncus*. Em 1945 Tseng propôs que o nome

carrageenana se restrinja a designar o polissacarídeo extraído de *Chondrus crispus* e *Gigartina stellata*.

Esse polissacarídeo sulfatado obtido dessas duas espécies dá uma fração chamada lambda-carrageenana insensível à ação do potássio, e uma fração "kappa" que se gelifica sob efeito desse íon. Respectivamente lambda e "kappa" perfazem 60 e 40% do D-galactose sulfatada e 3,6-anidro-D-galactose em quantidades aproximadamente equimolares, estrutura ramificada, (O'Neill, 1955) peso molecular entre  $1,8 \times 10^5$  e  $3,2 \times 10^5$  (Smith e cols. 1954), enquanto que o peso molecular de "kappa"-CRRG e lambda-CRRG que compõem-se quase totalmente de unidades D-galactose sulfatada (Smith e cols. 1955) está entre  $4$  e  $7 \times 10^5$  (Smith e cols. 1954).

Muitos efeitos da CRRG foram atribuídos à estrutura polissacárida e aparecem em vários outros compostos semelhantes. Diferenças entre "kappa" e lambda CRRG ocorrem em várias situações que levam à impressão geral de que lambda é mais potente quanto a propriedades biológicas que a "kappa" (Damas & Volon, 1982). A lambda é mais ativa como irritante na produção de respostas inflamatórias tanto agudas (Atkinson e cols., 1962) como crônicas (Mc Candless, 1965) bem como na atividade anticoagulante (Hawkins & Leonard, 1962, 1963) e quando a toxicidade sistêmica (Anderson & Duncan, 1965). Quanto à indução de granulomas por vários polissacáridos Mc Candless (1965) verificou que as peculiaridades da CRRG dependem de, primeiro, ser a galactose a principal hexose com ligação  $1 \longrightarrow 3$  ou alternando  $1 \longrightarrow 3$  e  $1 \longrightarrow 4$ , e segundo,  $C_6$  não pode ter substituinte. A configuração da galactose é irrelevante quanto a estas proprie-

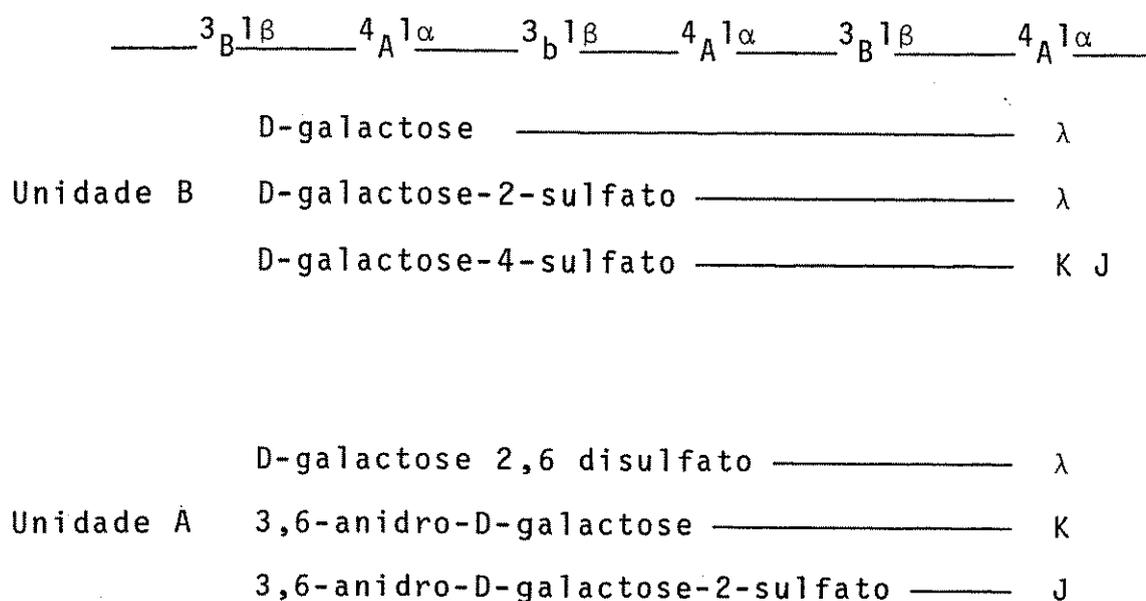
dades.

A produção de CRRG consiste de extração, purificação e isolamento. As espécies do gênero *Chondrus* e *Eucheuma* que formam a maior parte da CRRG usada por nós, crescem nas costas da América do Sul e do Norte, Europa e ilhas do Pacífico. Depois de seca ao sol ou mecanicamente, é lavada e misturada com água doce e alcalinizada, o que facilita sua extração e aumenta a estabilidade. Feita a extração, o resíduo é separado por filtração. Ele contém 1% de CRRG que é concentrada por evaporação até obter uma goma com 2-3% a qual se acrescenta álcool isopropílico onde a CRRG é insolúvel e da qual é extraída, secada e moída. Segue-se a purificação em carvão ativado, separação em partidas, cujas amostras são analisadas no laboratório. Conhecidas as propriedades de cada partida, são elas misturadas em proporções tais que lhe confirmam as características desejadas. O pó seco é embalado em sacos de polietileno e constituem o material disponível para seus vários usos. As CRRG são pós de cor marron claro que se revelam, sob pequeno aumento ao microscópio, como partículas semelhantes a fios curtos ou flocos finos. Sendo misturas de polímeros, sua densidade varia, geralmente em torno de  $1,7\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$  e são solúveis em água quente, acima de  $75^{\circ}\text{C}$  (Guiseley e cols., 1980).

A reatividade química das carrageeninas se deve primariamente aos grupos sulfatos-ésteres  $\text{R-O-SO}_3^-$  que são fortemente aniônicos. O ácido livre é instável e o que está disponível comercialmente são sais de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{++}$  ou, mais frequentemente, misturas deles. Os cátions associados juntamente com a conformação das unidades de açúcar na ca-

deia polimérica determinam suas propriedades físicas. Assim "kappa" e "jota", mas não a lambda carrageenina formam géis em presença de íons potássio ou íons cálcio. A reatividade com proteínas, entretanto, ocorre tanto com as carrageeninas que gelificam como com as que não o fazem. Na maioria dos casos, se não em todos, ocorrem interações íon-íon entre grupamentos sulfato da carrageenina e os grupos carregados das proteínas. A reação depende do ponto isoelétrico da proteína, do pH do meio, dentre outros fatores.

A repetitividade dos componentes nas várias carrageeninas pode ser representada simplificada da seguinte forma:



A carrageenina é um composto extraordinariamente interessante pelo amplo espectro de interferência com sistemas biológicos. Sua utilização principal em pesquisa é, sem dúvida, na produção de edema inflamatório agudo e, como dis

semos, frequentemente utilizado em testes de substâncias anti-inflamatórias (Winter e cols., 1962). Após sua injeção parenteral, dá origem a uma resposta aguda exsudativa (edema) e uma resposta tardia, crônica de natureza granulomatosa. Na fase aguda, ocorre pronunciada migração celular, enquanto que o granuloma é caracteristicamente de baixa proliferação celular e baixa frequência de penetração de novas células. Segundo Di Rosa, a migração celular se inicia virtualmente na segunda hora, quando já se pode surpreender 10 a 20 células por campo de alta resolução (c.a.r.). À quarta hora o exsudato já é abundante, encontrando-se em torno de 100 células por c.a.r., sendo representadas principalmente por polimorfos nucleares leucócitos (PNL) e monocleares (MN) na proporção aproximada de 70:30 respectivamente e ainda, ocasionalmente, macrófagos e fibroblastos. À sexta hora o aspecto da área de reação não se modificou mas já se contam 150 ou mais células por c.a.r., mantendo-se a relação entre os tipos celulares (Di Rosa, 1972). É principalmente na fase que vai da 5ª a 6ª hora que se testam os potenciais agentes anti-inflamatórios (Di Rosa e cols., 1971).

O granuloma produzido pela injeção de CRRG é caracteristicamente rico em colágeno. Atinge tamanho máximo em aproximadamente uma semana, é completamente reabsorvido por volta da 46ª semana (Jackson, 1957 e Slack, 1957), sendo por volta do 14º dia atingida a concentração máxima de colágeno, que de início se deposita nos microsomas.

A implantação subcutânea de comprimidos de CRRG em ratos (Atkinson e cols., 1962; Boris e Stevenson, 1964)

produz abcesso subcutâneo, cujas características foram estudadas por esses autores.

Pequenas quantidades de CRRG injetadas dão origem a anticorpos que são específicos quanto as formas estruturais "kappa" e lambda, enquanto que os animais sensibilizados mostram alterações nas respostas granulomatosas que passam a ser predominantemente hemorrágicas, com menor participação de colágeno (MacCandless & cols., 1967). Administrada por via intravenosa ou intraperitoneal repetidamente, a CRRG produz sensível inibição da reação de Arthus em ratos ou cobaias, porém a inibição do sistema de complemento só se consegue com doses tóxicas, como por exemplo 100 mg por rato, condição em que os animais já exibem franca letargia. Também reações de hipersensibilidade retardada são inibidas, o que se atribue a inativação sobre macrófagos, que são hiporeativos aos fatores liberados por linfócitos sensibilizados ou na reação antígeno-anticorpo (Humphrey, 1967). É possível que essa ação inibidora da hipersensibilidade retardada decorra também do exaurimento que a CRRG produz sobre o fator Hageman, depois de exercer sobre este uma fugaz ativação (Schwartz & Kellermeier, 1969).

As várias carrageeninas têm ação anticoagulante, sendo a lambda-CRRG mais poderosa quanto a esta ação, chegando a exercer quinze avos de ação da heparina na duplicação do tempo de trombina, tanto no plasma de homem como de cão. Anderson & Duncan, (1965) afirmam que os primeiros eventos da cadeia de reações da coagulação sanguínea são também afetados pela CRRG.

Tanto "in vitro" como "in vivo", em várias espécies animais, a CRRG inibe o sistema complemento hemolítico (Davies, 1963, 1965), pelo bloqueio que exerce sobre a ancoragem de C'1 na superfície de hemácias sensibilizadas, ou por interferência com o componente de C' que precede a fixação de C'1.

Incubando-se substratos plasmáticos com CRRG produzem-se cininas através da ativação de um processo proteolítico (Rothschild & Gascon, 1966). Se o plasma ou frações plasmáticas forem previamente aquecidos a 56°C por três horas, procedimento que destrói o "calicreinógeno" (Schachter, 1956), ainda há produção de cininas, sugerindo utilização da via precursora da plasmina (Di Rosa & Sorrentino, 1968), via esta que também é ativada pelo fator Hageman (Iatridis & Ferguson, 1965).

A pronunciada hipotensão arterial provocada pela CRRG quando administrada por via venosa (Di Rosa & Sorrentino, 1970; Noordhoek & Bonta, 1972) e que é franca e totalmente taquifilática, não se deixa afetar por antagonistas de receptores  $H_1$  (da histamina) mas pode ser abolida por anti-proteases, razão pela qual é atribuída à ação de cininas. Sabe-se entretanto que uma combinação, e só a combinação, de antagonistas de receptores da histamina e da serotonina inibe o edema dos primeiros noventa minutos da administração da CRRG, inibição que também ocorre com tratamento prévio pelo composto 48/80.

### III. CONTRA-IRRITAÇÃO

Uma substância anti-inflamatória ativa seria produzida no local da irritação (Robinson & Robson, 1964) podemdo, na dependência do tecido inflamado, aparecer no sangue, controlando então todo processo, limitando-o, não só no local, como também à distância.

Agentes irritantes, como o formaldeído, o ácido acético, soluções hipertônicas, injetados intraperitonealmente, reduzem a severidade de uma inflamação local. Tal não decorre de estimulação adrenal e provavelmente também não depende da dor. Decorreria de drenagem de fluído plasmático para a cavidade peritoneal, competindo assim com a formação do edema na pata (Jori & Bernardi, 1966). Mede-se nessas condições diretamente um acúmulo de fluido na cavidade peritoneal (azul de Evans). Sugere-se também que drogas como o ácido acetil-salicílico podem afetar o edema local em determininada condição experimental não só por seu efeito anti-inflamatório como também por sua ação irritante (Jori & Bernardi, 1966).

Também Laden e cols. (1958) sugeriram que do local onde se introduziu um agente flogógeno se libera um princípio capaz de exercer ação anti-inflamatória à distância. Rindani, já em 1956 havia afirmado, com base experimental, a existência de uma substância de natureza não-esteróide que, surpreendentemente, não se pode encontrar no soro desses animais injetados com um irritante, Billingham e cols., (1969).

Já em 1901, Winternitz mostrou que administrando

se óleo de santal a coelhos, esta substância, que se sabe produziu irritação gástrica, provoca inibição da resposta inflamatória produzida pelo veneno de abelhas, no saco conjuntival. Também a reação conjuntival ao óleo de mostarda pode ser inibida, em coelhos, pela injeção de caolin ou pelo carvão animal, ou ainda pelo próprio óleo de mostarda, e que tal inibição coincide, até certo ponto, com presença de lesões peritoniais.

O primeiro trabalho de valor científico sobre o fenômeno de contra-irritação foi publicado em 1895 por Gillies (citado por Bonta, 1978). Todavia o procedimento de se combater clinicamente a inflamação em determinado local do organismo provocando-se irritação em outro local é, provavelmente, o mais antigo dos métodos para aliviar a dor, sintoma frequentemente mais importante nos processos inflamatórios localizados.

Vários estudos mostraram que não há possibilidade de participação significativa de corticosteróides no processo de contra-irritação, através da estimulação do sistema hipofise-adrenal, pelo estresse do próprio processo irritativo (Bonta, 1978). Esse efeito anti-inflamatório produzido pela injeção de um irritante em local remoto foi demonstrado em animais hipofisectomizados e/ou adrenalectomizados sendo que pelo menos em um estudo demonstrou-se que ratos adrenalectomizados respondem com aumento em vez de inibição da contra-irritação (Atkinson & Hicks, 1975; Cygielman & Robson, 1963; Goldstein e cols., 1967; Horakova & Muratova, 1965; Laden e cols., 1958; Robinson & Robson, 1964). Portanto o efluxo de corticosteróides não é necessário para que ocorra

contra-irritação, nem para que se produza o exsudato com atividade anti-inflamatória, embora em uma investigação (Garcia Leme & Schapoval, 1975) essa atividade sõ se tenha manifestado em presença de adrenais nos animais de experiência. Em vários outros trabalhos hã evidência de que não se exigem mecanismos mediadores ligados ao adrenocortex (Billingham e cols., 1969; Bonta & De vos, 1969; Bonta & Noordhoek, 1973). Outro forte argumento contra a participação de substâncias secretadas pelo adrenocortex na contra-irritação é que no rato o principal esterõide da adrenal é a corticosterona que tem um efeito anti-inflamatõrio fraco. Di Pasquale e Girerd mostraram (1961) que exsudato inflamatuõrio de ratos adrenalectomizados exibe propriedades contra-irritantes ainda maiores que de animais normais.

Tambẽm a adrenalina tem sido proposta como responsãvel pela reação contra-irritativa jã que realmente tem propriedades anti-inflamatuõrias (Brown & West, 1965; Green, 1972). Bonta & De Vos (1968) demonstraram atravês de bioensaios a possibilidade da adrenalina participar como substãncia que, ligada a proteĩna do exsudato inflamatuõrio, produz anti-inflamação.

Quanto ã CRRG, que inibe a reação inflamatuõria e demagênica provocada por si mesma, foi proposto (Rocha Silva e cols. 1969) que a exaustão do bradiceĩninõgeno seria causa da supressão da resposta edemagênica, deixando insuficiente substrato para que a enzima, ativada ã distãncia, pudesse executar a reação de clivagem gerando o mediador. Essa hipótese tem entretanto sido negada por outros autores (Noordhoek & Bonta, 1972).

Outro sistema cogitado para explicar a contra-irritação foi o complemento, que se esgotaria também, face a solicitações múltiplas de várias inflamações simultâneas. A irritação tecidual pela CRRG realmente fixa  $C'_{11}$  no local, (Willoughby e cols., 1969; Di Rosa e cols., 1971) reduzindo sua disponibilidade e dos demais componentes da cascata em outros locais do organismo atingidos pelo agente inflamatório. A administração de CRRG i.p. ou s.p. promove depleção sistêmica do complemento embora esta pareça ser uma ação própria da CRRG e não de todos contra-irritante (Noordhoek & Bonta, 1974). Além da fixação local do  $C'$  a carrageenina também inibe  $C'_{11}$  (Davies, 1963).

Com a generalização do conceito de que toda substância irritante é potencialmente capaz de produzir inibição de processos inflamatórios, qualquer nova substância supostamente anti-inflamatória deve ser analisada quanto a capacidade de produzir irritação tecidual.

A notável complexidade do processo inflamatório, seja quanto as características do agente provocador, seja em relação ao tecido diretamente envolvido, ou ao organismo como um todo, respondendo com recursos adicionais aos estímulos de intensidade-duração variáveis, permite antecipar as dificuldades próprias do estudo da contra-irritação, na medida em que se insere no conjunto de reações homeostáticas, limitantes ou moderadoras da própria reação inflamatória.

A inibição em uma área distante não se restringe a processos agudos. Dentre os processos experimentais, a formação do granuloma pela implantação do "pellet" de algodão, ou pela carrageenina, e mesmo a cicatrização de feridas,

ou ainda o componente artrítico da doença auto-imune provocada pelo adjuvante de Freud são todos susceptíveis de inibição por meio de reação irritante (Hicks, 1969; Robinson e Robson, 1964; Goldstein e cols., 1967; Selye e cols., 1969; Cygielman e Robson, 1963).

Proposição - Considerando o exposto, decidimos estudar as características do edema produzido pela carrageenina no rato, reavaliando alguns pontos discordantes principalmente a influência de processos inflamatórios de decurso simultâneo. Decidimos, face a reconhecida complexidade do assunto, evitar ao máximo a introdução de drogas nos experimentos, aceitando as limitações (restrições) que estas têm trazido à interpretação de número imenso de estudos, como consequência também do conhecimento incompleto que se tem quanto dos fatores endógenos por elas liberados, ativados ou inibidos.

MÉTODOS

## MATERIAL E MÉTODO

## I. MATERIAL

## A. ANIMAIS

Foram utilizados (585) ratos Wistar, machos ou fêmeas, pesando 100 a 140g, procedentes do Instituto Biológico de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Biotério Central da UNICAMP.

## B. MEDIDOR

Foi construído na Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto, totalmente de vidro e conexões de borracha, de acordo com o modelo usado a muitos anos naquela Instituição (Fig.01).

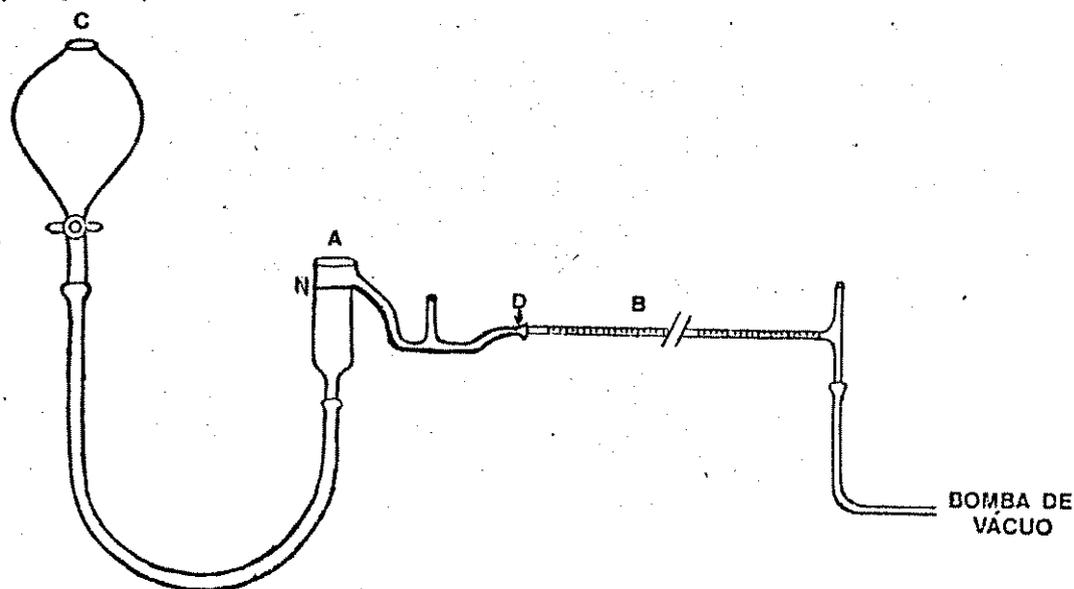


Fig.01 - Esquema do Pletismógrafo - A: cuba para imersão. B: tubo com escala graduada. C: reservatório da solução de lauril-sulfato de sódio. D: junção de borracha onde se insere agulha e seringa para ajuste do zero. N: nível da solução (segundo Windere cols., 1957).

## C. DROGAS

	Abreviaturas	Procedência
Ácido acético glacial.....		Merck
Bifosfato de histamina.....	(H).....	Sigma
Carrageenina.....	(CRRG).....	Marine Colloids
Carbonato de sódio.....	(Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ).....	Baker
Cloreto de sódio.....	(NaCl).....	Baker
Cloridrato de papaverina....	(PAV).....	"BDH"
Cloridrato de tetracaína....	(TTRC).....	Hoechst
Dextran 40.....	(DXT).....	Darrow
Etanol.....		Baker
Eter anestésico.....		Rhodia
Formaldeído.....	(FRM).....	Alba
Indometacina.....	(IDMC).....	Merck Sharp & Dhome

## II. MÉTODOS

## A. PREPARO DOS ANIMAIS

Lotes de quarenta animais trazidos ao laboratório foram transferidos para caixas plásticas de 40 x 25 x 20 cm contendo palha de arroz como cama, oito animais por caixa, foram marcados na cauda e pesados diariamente. A escolha dos animais que comporiam os lotes experimentais foi feita por casualização, havendo entretanto descarte daqueles que se mostravam discrepantes quanto ao ganho de peso. Após esta escolha, eram separados, agora cinco em cada caixa e mantidos no laboratório até o momento em que se procedia a medida dos valores iniciais das patas, de modo que a aplicação da CRRG se fazia sempre por volta das 09:00 horas. Doze horas antes do experimento retirava-se a ração sólida. Ini-

ciada a fase inflamatória, permaneciam também sem acesso à água.

#### B. PREPARO DAS SOLUÇÕES E SUSPENSÕES

Carrageenina para aplicação subplantar: para obter suspensão facilmente homogenizável, 25mg de CRRG eram pesados e adicionados a 2 ml de soro fisiológico (SF) e 3ml do mesmo soro colocados sobre o pó, aguardando-se alguns minutos para sua hidratação. Finalmente o material era homogenizado por meio de um misturador elétrico. A suspensão de CRRG era preparada sempre em NaCl 0,9%, salvo quando indicado, agitada antes da aplicação e re-agitada entre a administração a um e outro lotes. A administração subplantar de CRRG marca o tempo zero em todos os experimentos. A mesma suspensão foi usada para as aplicações subcutâneas.

Carrageenina para aplicação intraperitoneal: foi diluída em SF a partir da suspensão padrão descrita, e administrada na dose de  $4,5 \text{ mg.Kg}^{-1}$ .

O dextran e o bifosfato de histamina foram preparados em água destilada. A indometacina foi preparada em solução aquosa de carbonato de sódio a 2% acrescida de 1 ml de etanol. Essa mistura diluidora foi administrada também ao grupo controle.

Extratos de plantas: os extratos foram obtidos a partir de pó de folhas selecionadas de *Sissus sulcicaulis* Planch. (Fam. Vitaceae) (CSS), *Senecio africanus* Hort. ex Poir. (Fam. Compositae) (SEN) e de pétalas de *Brugmansia suaveolens* Bercht. & Presl (Fam. Solanaceae) (BRUG) secas em estufa. A extração foi feita em solução aquosa de NaCl

0,9% na proporção de 100mg do pó para 10 ml, sob fervura branda durante 5 minutos. O material assim obtido foi filtrado em papel, o volume reconstituído para 10ml foi injetado intraperitoneal (I.P.) ou intravenosamente (I.V.) após equilíbrio com a temperatura ambiente.

#### C. ESQUEMAS DE TRATAMENTO

Os tratamentos intraperitoneais foram feitos em três aplicações, nos tempos -1/2, 0 e 1/2 horas (tempo zero correspondente a injeção subplantar de CRRG) em volume de 0,4ml por aplicação, com exceção dos extratos de plantas que foram injetados sempre 0,3ml por aplicação. As administrações I.V. dos extratos foram feitas uma hora depois da CRRG subplantar e a IDMC e seu solvente aplicados 30 minutos antes da injeção subplantar.

#### D. ADRENALECTOMIA

Após tricotomia na região a ser aberta, e com os animais levemente eterizados, foi feita uma única incisão na pele da região média dorsal e rebatida a pele, divulsão da camada muscular a nível da última costela. Fenestrado o peritônio e expostas as glândulas adrenais foram estas logo excisadas completamente. Recomposta a musculatura, foi dado um ponto de sutura na pele. No período pós-cirúrgico os animais receberam além da dieta normal, solução aquosa de NaCl 0,9% em substituição a água de bebida. Quatro dias depois da adrenalectomia tinha início a fase inflamatória do experimento, ao fim da qual os animais foram necropsiados para confirmação de ausência das adrenais.

### E. IMOBILIZAÇÃO (IMOB)

Vinte animais foram divididos em dois grupos, controle e IMOB. Neste último, foram mantidos em jejum por tempo variável de acordo com o procedimento experimental, e logo a seguir anestesiados pelo éter, imobilizados individualmente em uma tela de arame, de modo que os quatro membros ficassem presos, perpassando os orifícios da tela. As telas foram então fechadas em volta do corpo do animal e presas com fita adesiva, cuidando-se para não induzir prejuízo respiratório. Os animais assim "telados" foram mantidos suspensos por meio de dois fios que permitiam um mínimo de oscilação, em ambiente com temperatura entre 24 e 28°C e em luminosidade permanente, sem acesso a água ou alimento sólido. O grupo controle constituído de duas gaiolas com cinco animais foram retirados da tela, repesados, divididos também em dois grupos de cinco animais e a seguir todos, controle e IMOB, receberam CRRG subplantar e a metade deles, cinco controles e cinco IMOB receberam adicionalmente CRRG por via intraperitoneal.

Imediatamente depois das medições pletismográficas os animais foram sacrificados, a cavidade abdominal foi aberta, os estômagos retirados e examinados sob lupa, de acordo com o procedimento descrito por Brodie & Hanson (1960). Seguindo a orientação destes autores, as lesões foram avaliadas apenas qualitativamente.

### F. PRODUÇÃO E MEDIDA DO EDEMA

Os animais foram injetados sempre as 09:00 horas da manhã com 0,1ml de suspensão de CRRG a 0,5% em NaCl 0,9%.

O material para injeção, perfeitamente limpo e seco, seringa de insulina, agulha 20x5 foi carregada com 0,1ml da suspensão recém-homogeneizada. A superfície plantar foi limpa com auxílio de algodão embebido em álcool 70%. Feita a aplicação na pata direita ou na esquerda, ou em ambas, conforme indicado, na retirada da agulha fazia-se compressão sobre o ponto de penetração, durante alguns segundos.

A primeira leitura era efetuada trinta minutos antes da aplicação da CRRG por via subplantar. A segunda leitura foi efetuada sempre trinta minutos depois da administração da CRRG e, as demais, nos tempos 1, 2, 3, 4, 5 e 7 horas contadas sempre a partir do momento da aplicação do agente flogógeno. Ao longo do experimento os animais foram mantidos em jejum, à temperatura ambiente, de aproximadamente 25°C.

As medidas foram efetuadas imergindo-se a pata até a marca previamente feita com tinta, a nível da articulação tíbio-tarsal. O intervalo das medidas entre um e outro animal é de aproximadamente um minuto, tempo necessário apenas para retornar o animal à caixa, efetuar a sucção da suspensão de lauril-sulfato e recolocar esse líquido ajustando o no nível adequado, na cuba de imersão.

A confiabilidade das leituras efetuadas foi reavaliada periodicamente por meio de um padrão, constituído de uma barra cilíndrica de metal, niquelada, contendo dois sulcos em anel delimitando dois segmentos os quais, imersos na cuba do pletismógrafo, provêm medidas rápidas cujas médias e desvios indicam a precisão e exatidão dos valores fornecidos pelo aparelho.

### G. COLETA DO FLUÍDO DO EDEMA

Três animais, 1 hora depois da injeção de CRRG s.p., foram gentilmente contidos, suas patas posteriores colocadas sob a lupa com a superfície plantar voltada para cima e, pelo orifício da injeção subplantar prévia, se observa que o líquido do edema emerge espontaneamente. Por meio de uma pipeta Pasteur, aspirou-se delicadamente este fluído. A compressão da pata para acelerar a saída de líquido provoca efluxo de material soro-sanguinolento, e foi por isso evitada. A emergência do fluído pode ser acelerada quando a pata do animal é colocada em sua posição normal. Feita a coleta 0,1ml do material obtido foi transferido da pipeta Pasteur para uma seringa de insulina e administrado por via subplantar a outro animal, no tempo correspondente a uma e meia horas.

### H. ELABORAÇÃO DOS RESULTADOS

O volume do edema é sempre a diferença entre  $V_t$  e  $V_0$ , isto é, entre o volume do edema em dado instante e o volume obtido trinta minutos antes do início do experimento. Assim, cada cinco leituras dão origem à média de um grupo, naquele tempo, que corresponderá a um ponto nos gráficos que mostram a evolução do edema naquela condição experimental.

### I. TRATAMENTO DOS RESULTADOS E APRESENTAÇÃO GRÁFICA

Fator de conversão: pipetando-se 1ml da solução lauril-sulfato de sódio e colocando na cuba A completada até o nível N da cuba de imersão (Fig. 01), o volume da massa lí

quida deslocada foi lido diretamente na haste horizontal gr duada. A m édia de cinco valores assim obtidos foi usada como fator de conversão (f) sendo todas as leituras feitas com aproximação de uma casa decimal, obtida a diferença V' entre os volumes lido (Vt) e o inicial (V<sub>0</sub>) e multiplicando por f/1000 obtêm-se o volume do edema, diretamente em micro litros.

$$V(\text{microlitros}) = \frac{V' \times 1000}{f}$$

onde:  
 $V' = V_t - V_0$   
 f = fator de con versão

A evolução do edema de pata pode ser rigorosamen te acompanhada na fase aguda por meio das curvas obtidas pela união dos pontos de leitura nos tempo 1/2, 1, 2, 3, 4, 5 e 7 horas, sendo cada ponto m édia de cinco medições o que é clássico em estudos dessa natureza. A análise de significân cia da diferença entre as curvas foi feita considerando duas curvas diferentes entre si quando três ou mais pontos medi dos diferirem significativamente a nível de 5%. Esta anã lise, foi feita pela aplicação do teste "t" de Student.

RESULTADOS

## RESULTADOS

Baseados em observações anteriores suspeitávamos de que concentrações de cloreto de sódio no solvente de CRRG pudesse afetar a intensidade do edema. A Fig.02 mostra os resultados obtidos da administração de 0,5mg de CRRG nas patas direitas de ratos, volume da solução 0,1ml, concentrações de NaCl variando de 0 a 1%. Apesar dos resultados das curvas C e D podemos observar que os edemas são inversamente proporcionais a concentração do NaCl do solvente. Notar que a curva D, discrepante, é a única em que o solvente é hipertônico.

Para uma mesma concentração do cloreto de sódio analisamos a influência da variação de volume de sua solução isotônica na cavidade peritoneal. A Fig.03 mostra os resultados obtidos quando essas soluções foram aplicadas por três vezes consecutivas a três grupos de cinco animais, nos volumes 0,1, 0,3 e 0,4ml e um quarto grupo, para efeito comparativo recebeu 0,4 ml de CRRG. Observar que a partir da segunda hora estabelece-se uma estrita correlação volume-efeito como mostram as curvas A, B e C.

Foi estudado o efeito da administração intraperitoneal de CRRG sobre o edema de pata, padrão, isto é, 0,5 mg dessa substância em 0,1 ml de SF por via subplantar. Foram utilizados quarenta animais em dois experimentos. No primeiro, um mesmo volume de suspensão de CRRG contendo zero, 0,2, 0,4 ou 0,8 mg por quilo foi administrado com duas repetições, nos tempos -30, zero e 30 minutos. No segundo experimento, também com vinte animais, em tudo seme-

lhante ao anterior, exceto quanto a dose total que foi mantida constante, os volumes, variaram de 0,2, 0,5 a 0,8 ml. Os resultados podem ser observados nas Figs. 04 e 05.

Observa-se que com zero, 0,2 e 0,4 mg de CRRG mantêm-se a relação concentração-efeito enquanto que as inibições produzidas pela variação de volume mantêm também proporcionalidade direta. Neste teste, 0,4mg, parece ser uma concentração máxima em relação ao específico efeito considerado.

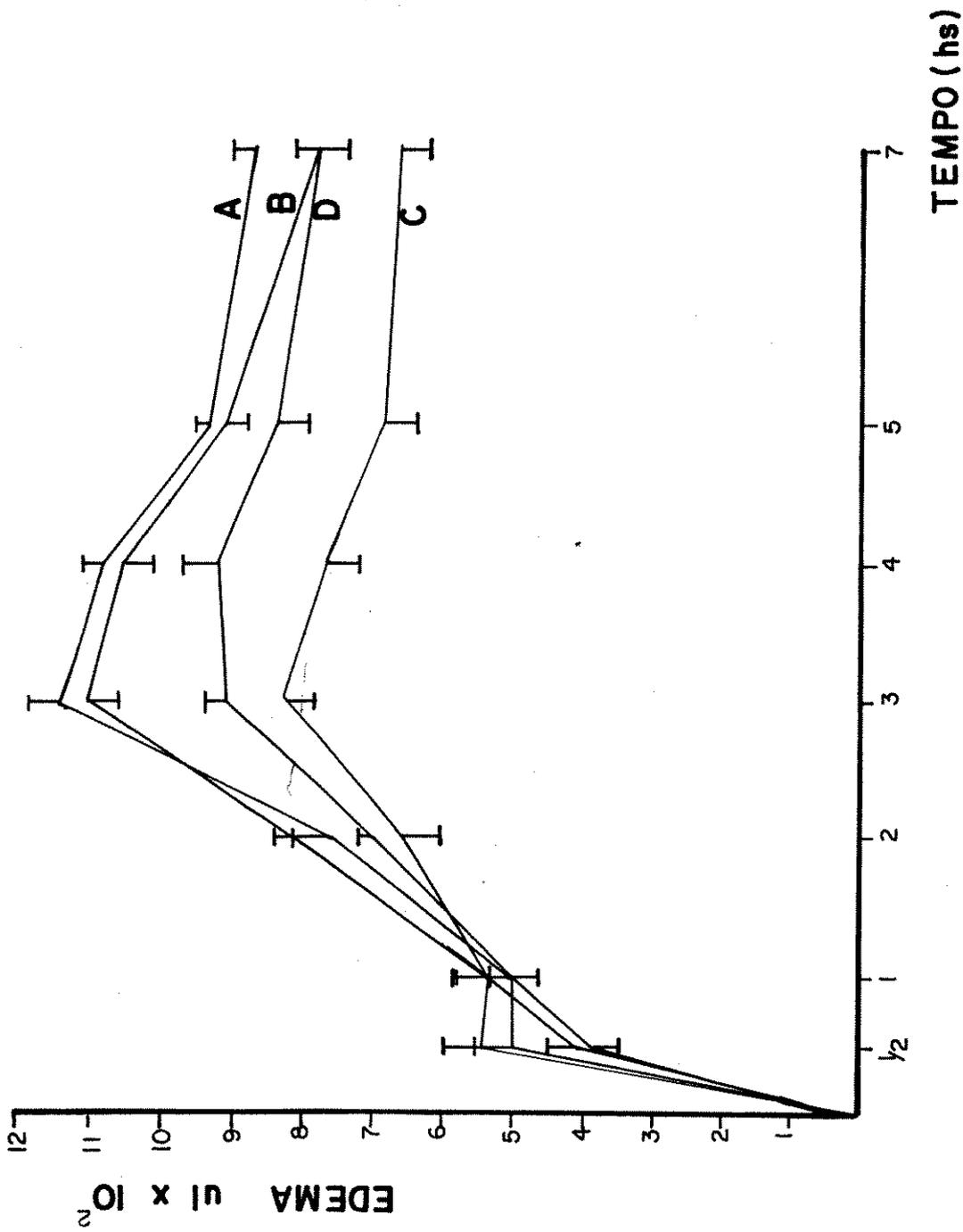


Fig.02 - Evolução do edema produzido pela CRRG subplantar dissolvido em salina de diversas concentrações. Curva A, água destilada. B, NaCl 0,33%. C, NaCl 0,66%. D, NaCl 1%. São significantes as diferenças Ax C e BxC.

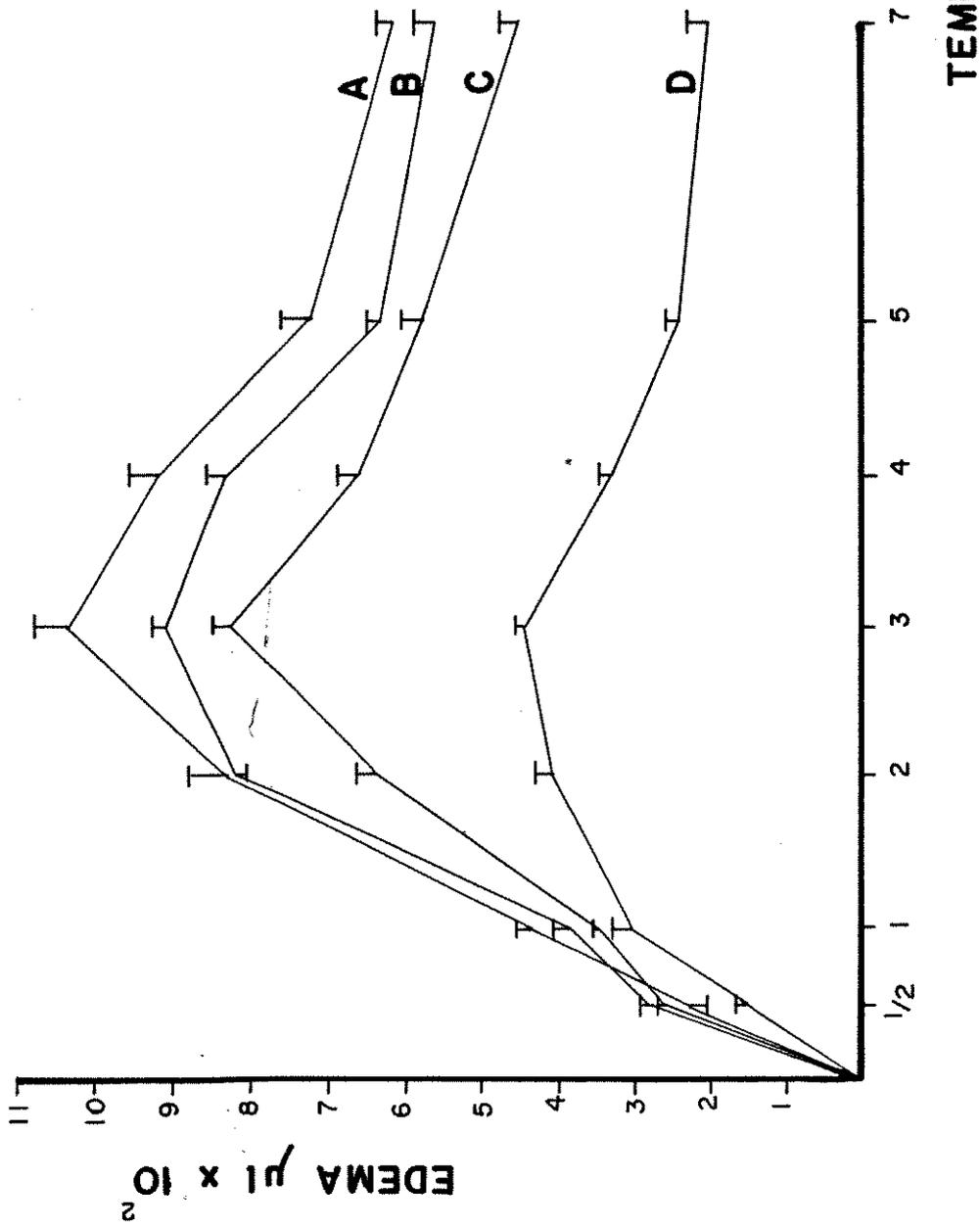


Fig. 03 - Edema de pata pela CRRG. Os grupos A, B e C, foram injetados com 0,1, 0,3 e 0,4 ml de SF respectivamente, com duas repetições (nos tempos -30, zero e 30 minutos) enquanto que a CRRG (grupo D) foi administrada no mesmo esquema, na dose de  $1,5 \text{ mg.Kg}^{-1}$ . São significantes as diferenças, AxC, AxD, BxC, BxD e CxD.

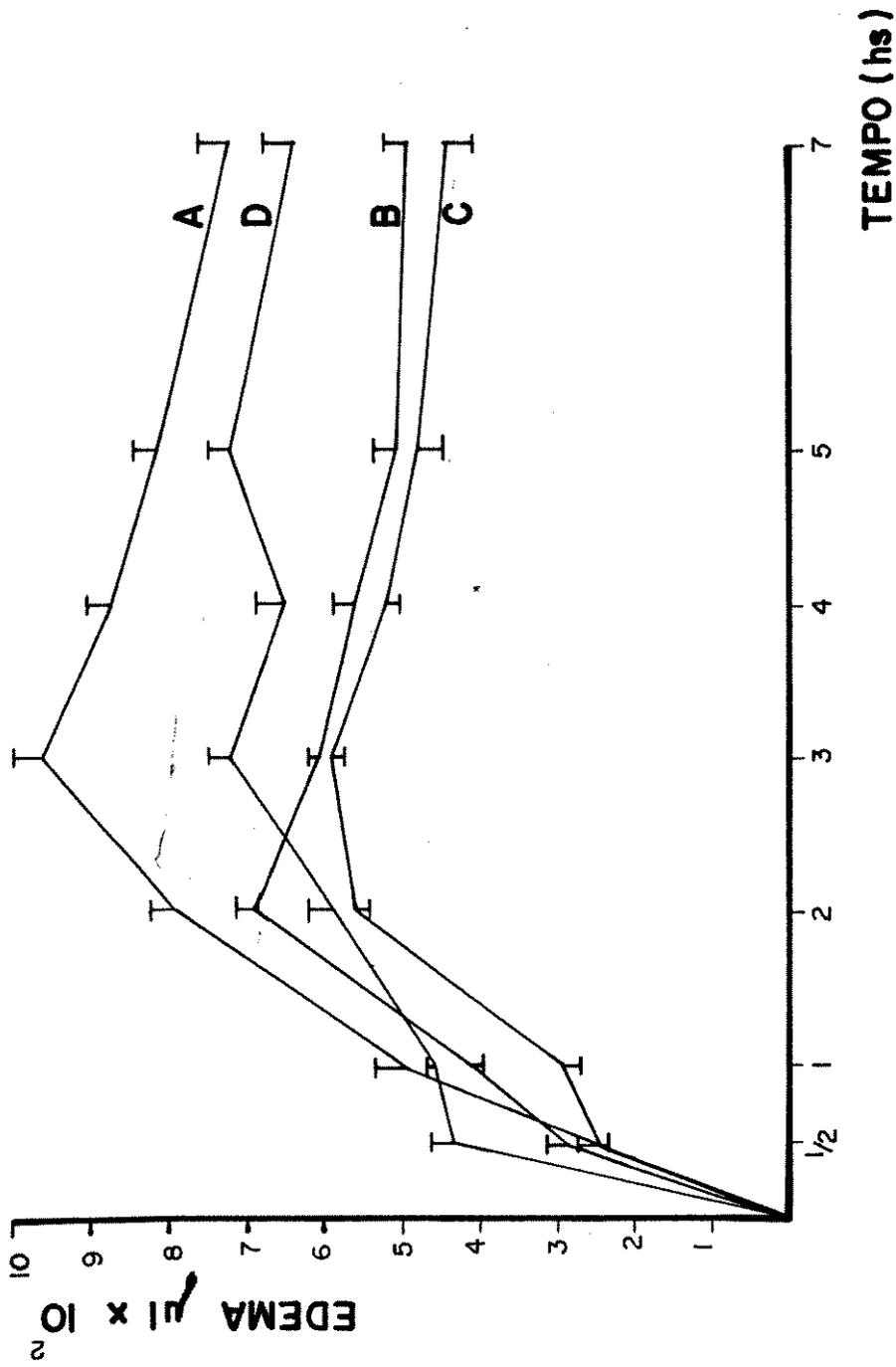


Fig.04 - Influência de diferentes doses de CRRG por via intraperitoneal (3 aplicações, em volume de 0,4 ml cada uma), sobre o edema de pata. Curva A, SF i.p. B, CRRG 0,8 mg.Kg<sup>-1</sup>. C, 0,4 mg.Kg<sup>-1</sup> e D, 0,2 mg.Kg<sup>-1</sup>. São significantes: AxB, AxC, AxD, BxD e CxD.

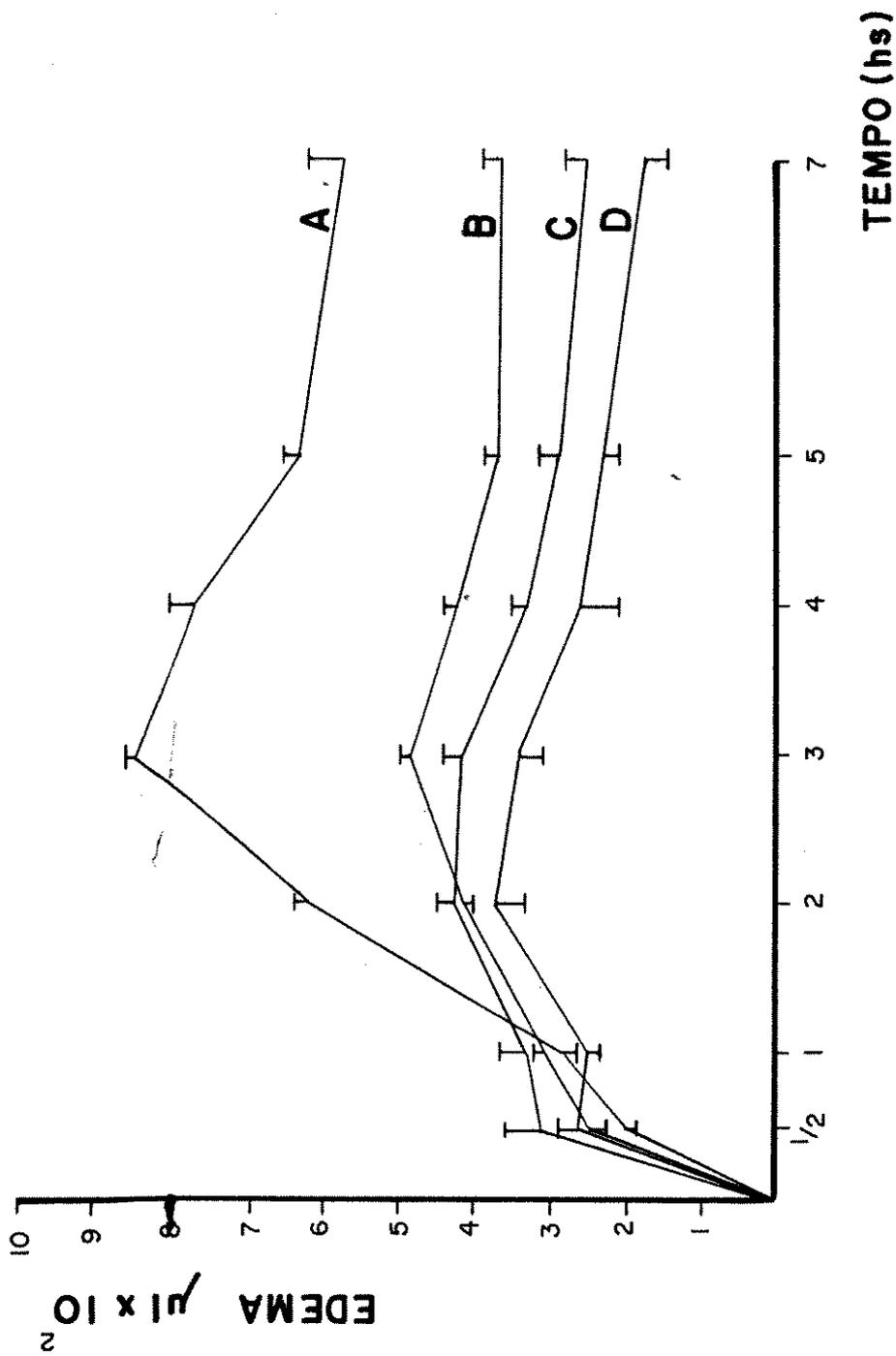


Fig.05 - Efeitos produzidos pela administração intraperitoneal de CRRG ( $4,5 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ) variando-se os volumes. Curva A, SF (0,2 ml). B, CRRG (0,2 ml). C, CRRG (0,5 ml) e D, CRRG (0,8 ml). São significantes as diferenças AxB, AxC, AxD, BxC e BxD.

Os resultados do experimento mostrado na Fig.06 confirmam integralmente o esperado: o solvente da CRRG, solução de pH alcalino, contendo pequena fração de etanol, inibe parcial, porém significativamente o edema de pata. A IDMC nesse solvente acrescenta significativa inibição (curva C) que não pode ser aumentada com a dose (curva D).

Esse mesmo solvente administrado pelas vias I.P. e I.V. produziu graus diferentes de inibição de edema, como se pode observar na Fig.07 que mostra também o efeito da IDMC na mesma concentração do experimento anterior, podendo-se observar o atraso no desenvolvimento do edema bem como a ausência do característico pico máximo na terceira hora.

Os extratos de *Cissus sulcicaulis* (CSS) e de *Brugmansia suaveolens* (BRUG) pelas vias intraperitoniais (não mostrado) e intravenosa (Fig.08) produziram inibição significativa do edema pela CRRG. *Senecio africanus* (SEN), por estas duas vias, produziu um atraso no desenvolvimento do edema, com pico na quarta hora. Verificamos através da análise destes resultados que houve semelhança dos efeitos obtidos com os extratos, pelas duas vias utilizadas, I.P. e I.V., mostrando que o edema máximo é significativamente inibido pelo extrato aquoso, e que os efeitos provocados pelas três plantas não diferem estatisticamente entre si.

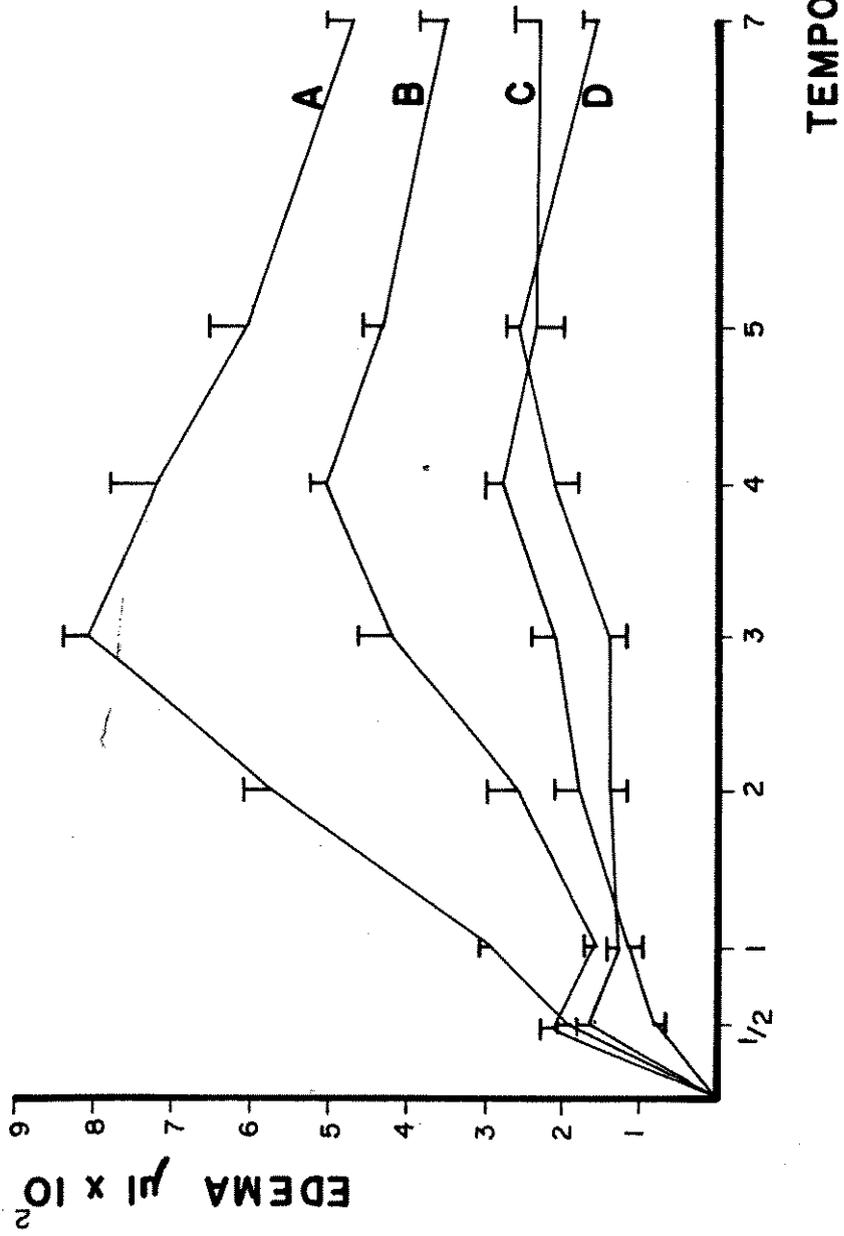


Fig.06 - Efeito da indometacina (IDMC) administrada i.p. sobre o edema produzido pela CRRG s.p. Curva A, CRRG s.p. (controle). B, solvente de IDMC i.p. C, IDMC 10 mg.Kg<sup>-1</sup> e D, IDMC 20 mg.Kg<sup>-1</sup>. São significantes: Ax B, Ax C, Bx C, Ax D e Bx D.

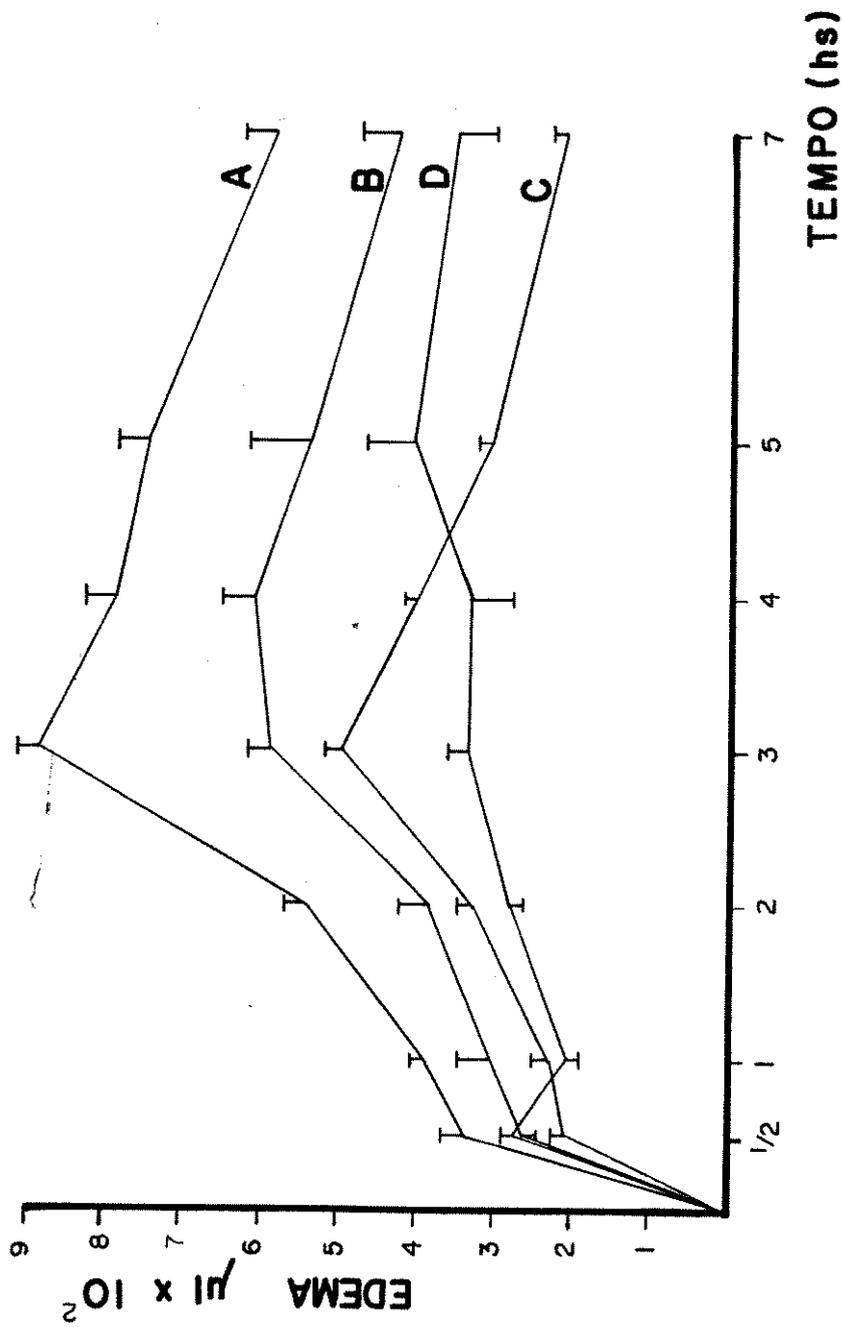


Fig.07 - Efeito da indometacina (IDMC) sobre o edema de pata produzido pela CRRG. Curva A, CRRG s.p. (controle). B, solvente de IDMC i.p. C, solvente de IDMC i.v. e D, IDMC i.v. (10 mg.Kg<sup>-1</sup>). São significantes: AxB, AxC, AxD, BxD e BxC.

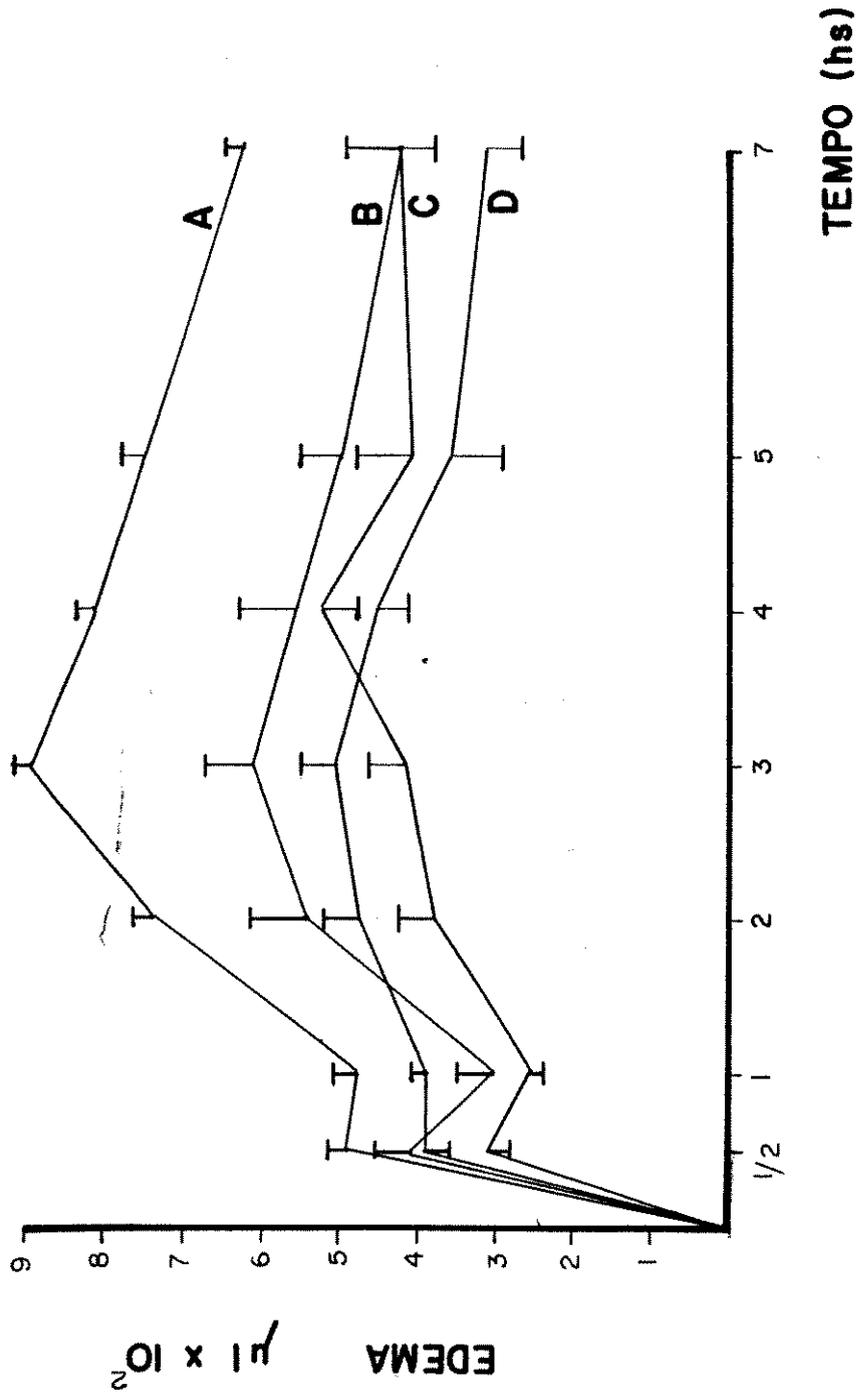


Fig. 08 - Efeito da administração i.v. de extratos de plantas: Cissus sulcicaulis (curva B), Senecio africanus (curva C) e Brugmansia suaveolens (curva D) sobre o edema produzido pela CRRG subplantar. Curva A, NaCl 0,9%. São significantes: Ax B, Ax C e Ax D.

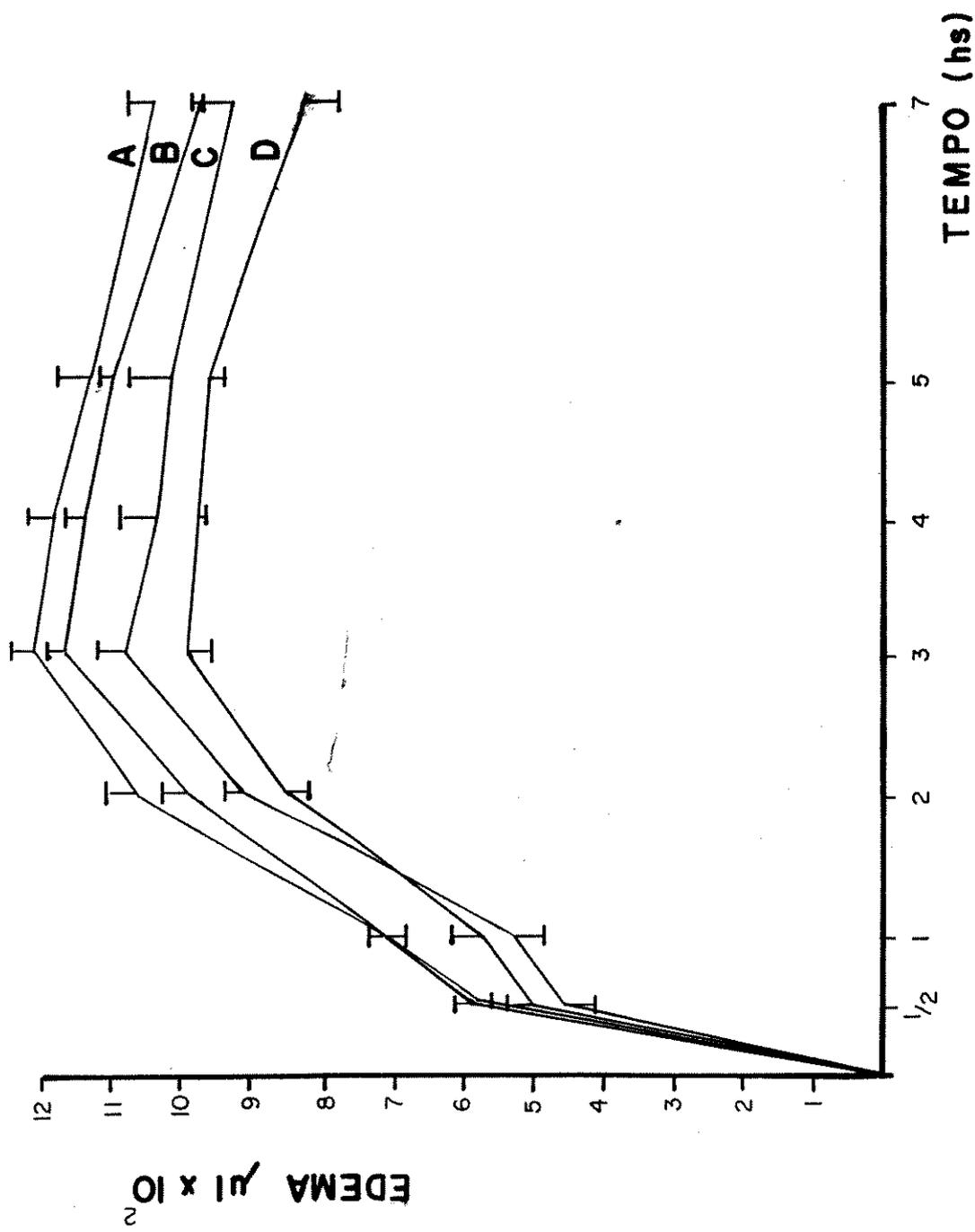


Fig.09 - Influência do mesmo estímulo contra-irritante sobre o edema de intensidade variável, à CRRG. Curvas A e B, resposta edematôgena a 1 e 0,5 mg de CRRG respectivamente. C e D, em presença de SF intraperitoneal. São significantes as diferenças: Ax C, Ax D e BxD.

Podemos verificar pela Fig. 09 que existe um estrito paralelismo entre as respostas obtidas no desenvolvimento do edema que ocorre por conta dos estímulos aplicados, ou seja, por diferentes concentrações de CRRG e SF, I.P.

Comparando a curva A (CRRG 1mg) com a curva B (0,5mg), embora as diferenças entre elas não tenham sido significantes no nível escolhido,  $P < 0,05$ , observamos que o edema foi sistematicamente menor a partir da primeira hora.

Constatamos que a resposta biológica às injeções I.P. se mostra de tal forma constante que se pode apreciar uma redução realmente gradual quando analisamos as curvas na ordem A, B, C e D. Isto demonstra uma verdadeira relação estímulo-efeito incluindo como estímulo, manifestação endógena à agressão, juntamente com a variação da concentração de CRRG.

Esse experimento mostra também que quando a capacidade de resposta inflamatória dos animais é ótima, não há aumento de resposta quando se passa de 0,5 para 1mg de CRRG em 0,1ml injetada na região subplantar do rato.

As Figuras 10 e 11 mostram resultados dos experimentos em que o efeito do SF administrado por via subcutânea foi comparado com o da sua aplicação intraperitoneal, analisa o efeito real do componente injetado, em relação às respostas inibitórias eventualmente produzidas pela manipulação do animal (contenção), bem como a dor provocada pelas injeções. Sobre o mesmo tema realizamos mais dois experimentos nos quais a agressão ("stress") aguda da imobilização mostra como se modificam as respostas edematógenas na pata, produzidas pela CRRG. As curvas B, C e D nas Figuras 10 e

11 diferem dos respectivos controles em ambos experimentos , nos quais, entretanto não diferem entre si, demonstrando que a inibição produzida nessas condições não vai além dos níveis atingidos, e que decorreu muito mais da agressão do procedimento experimental. Os resultados que se podem observar nas Figuras 12 e 13 confirmam e completam os anteriores revelando mais uma vez a importância de fatores ligados ao "stress" sobre a reação de um organismo à presença de um agente flogógeno. Observa-se através da curva C (Fig. 13) como são aditivos os efeitos dos componentes químicos e mecânico-metabólico.

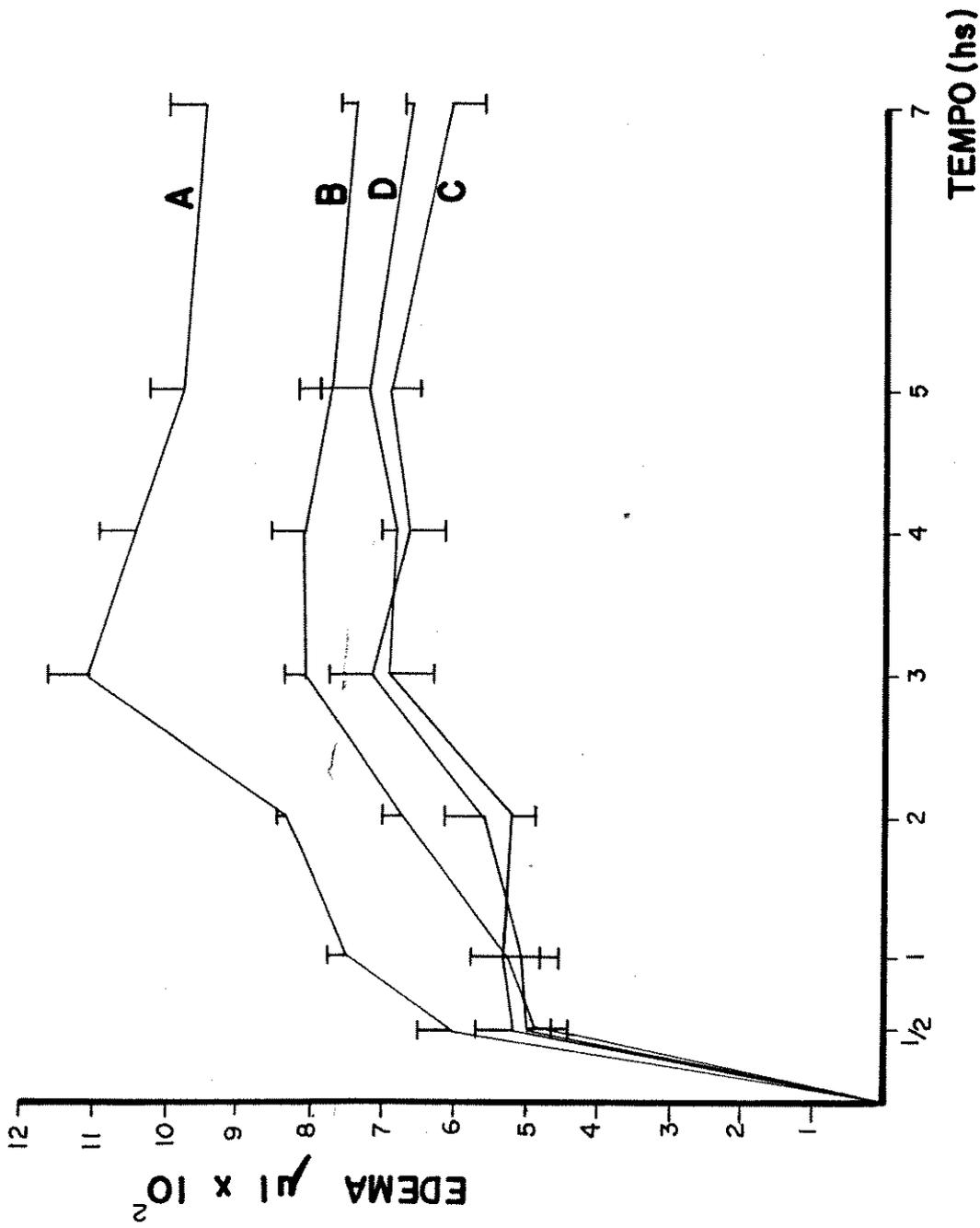


Fig.10 - Depois da injeção subplantar de CRRG (4 grupos de 5 ratos) cada animal (exceto grupo A) recebeu subcutâneamente 0,2 ml de SF aos 10, 20 e 50 minutos. Esse tratamento foi seguido de aplicações adicionais de salina a cada hora (C) ou de injeção apenas simulada (D), nos locais indicados pelas setas. São significantes as diferenças: AxB, AxC, AxD e BxD.

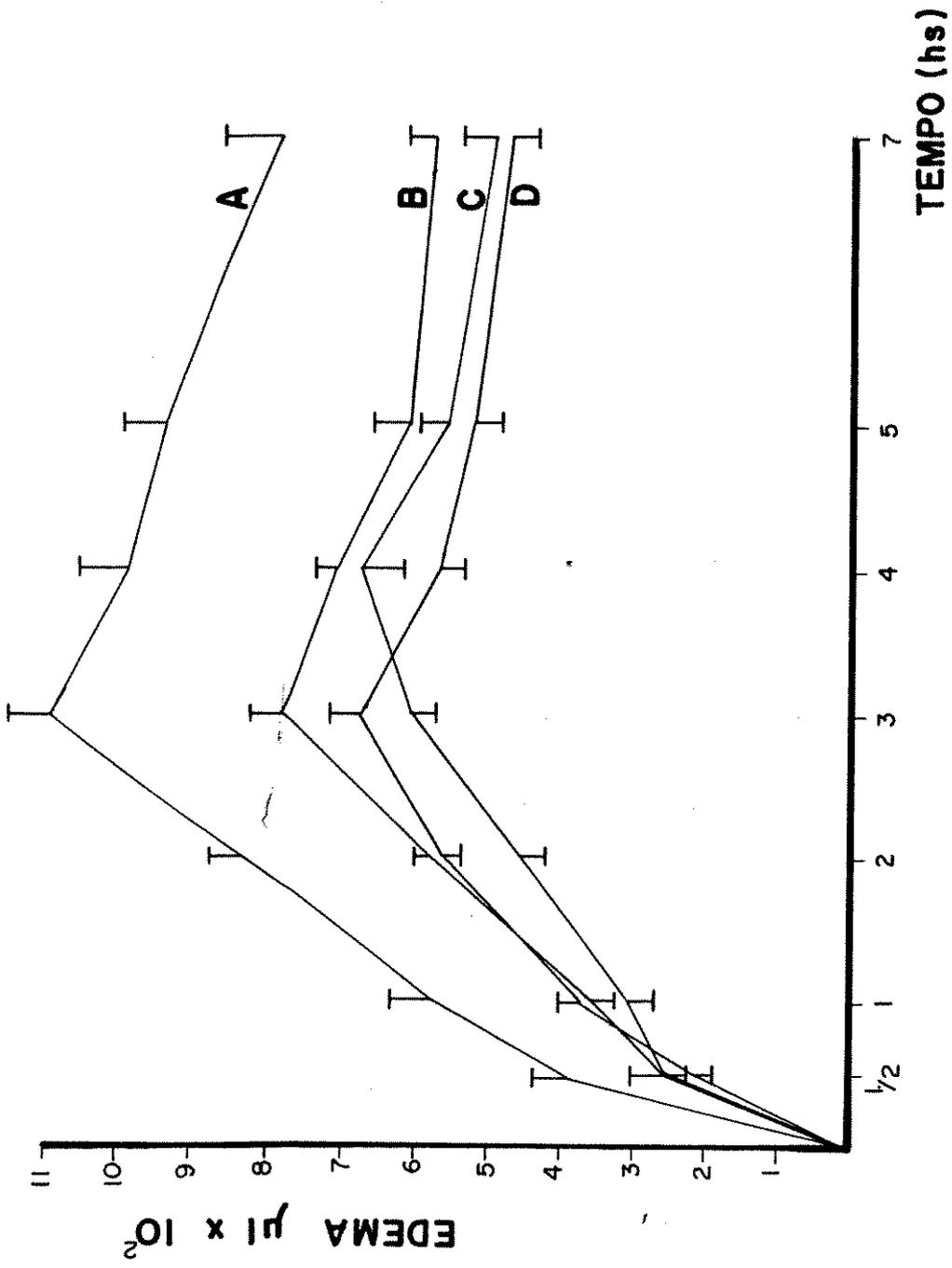


Fig.11 - Injeções intraperitoneais de SF (3 vezes 0,3 ml , aos 10, 20 e 50 min) nos grupos B, C e D seguidas de 6 aplicações simuladas de hora em hora (grupo D), nos tempos indicados pelas setas. O grupo A é testemunho. São significantes as diferenças: Ax B , Ax C, Ax D e BxD.

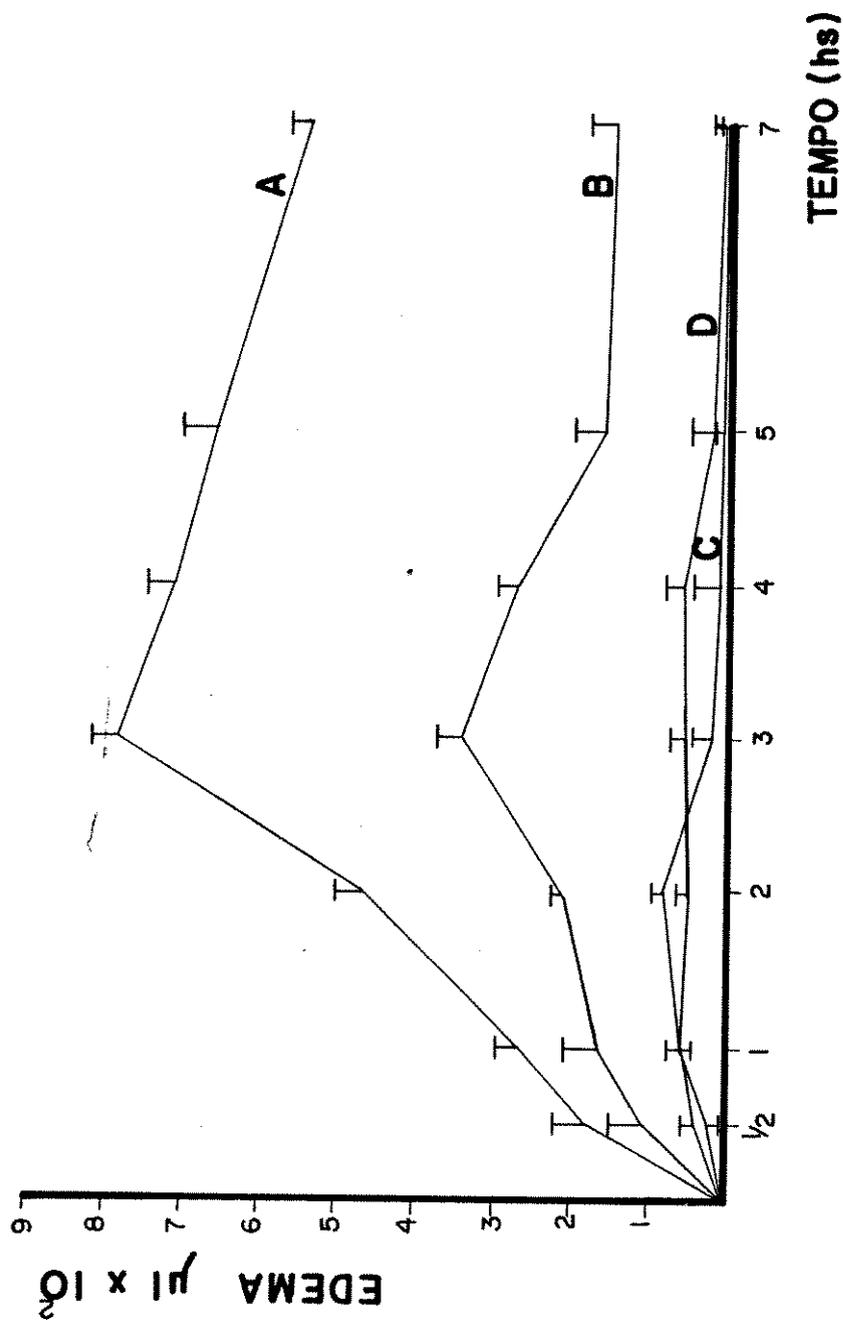


Fig.12 - Efeito da imobilização (IMOB<sub>40</sub> hs) sobre o edema produzido pela CRRG subplantar e sobre a inibição deste pela CRRG i.p. Curva A, SF i.p. B, CRRG i.p. C, CRRG i.p. + IMOB e D, SF i.p. + IMOB. São significantes as diferenças: AxB, AxC, AxD, BxC e BxD.

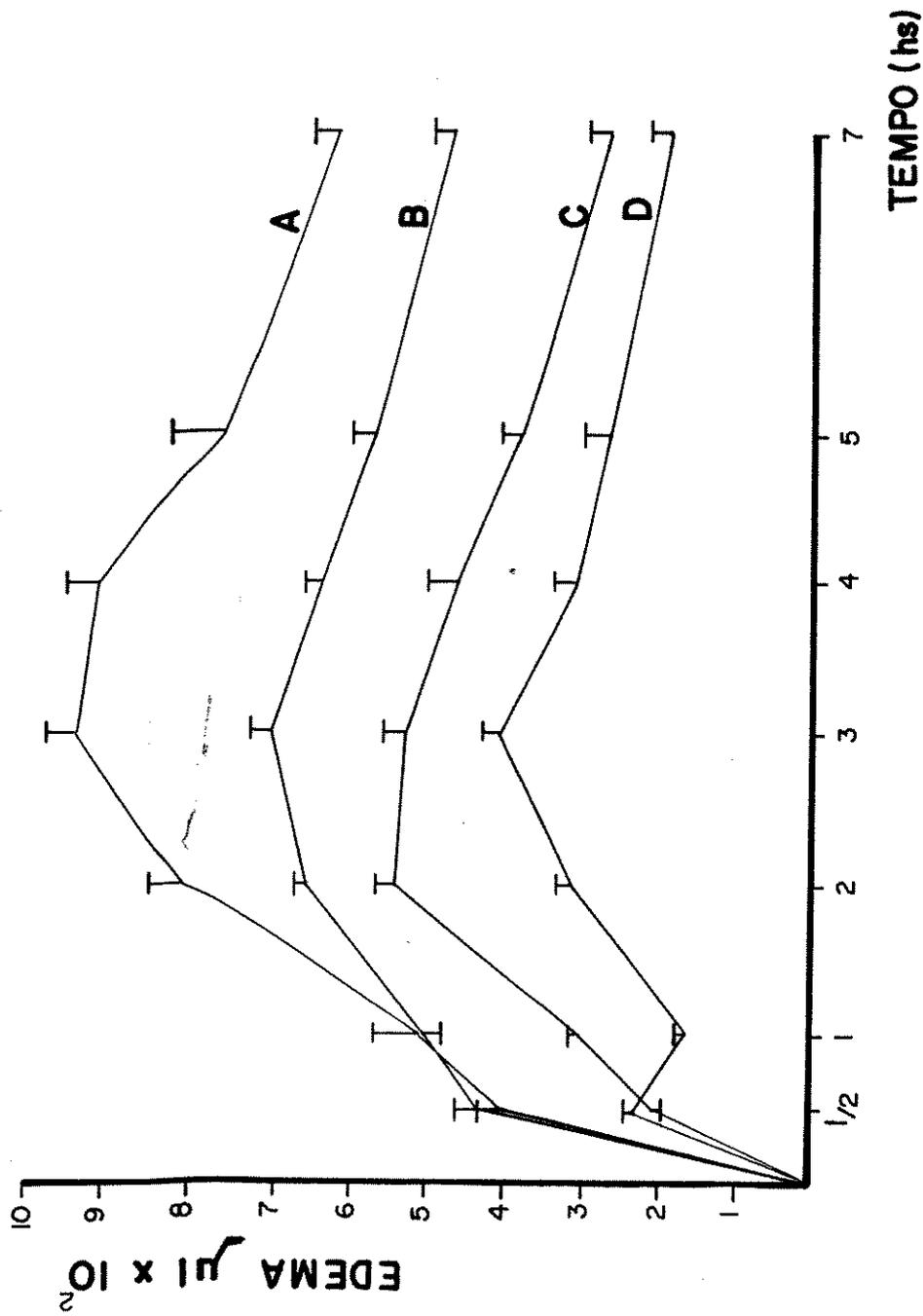


Fig.13 - Efeito da imobilização (IMOB<sub>6</sub> hs) sobre o edema de pata pela CRRG e sobre a inibição deste pela CRRG i.p. Curva A, SF i.p. B, CRRG i.p. C, CRRG i.p. + IMOB e D, SF i.p. + IMOB. São significantes as diferenças: AxB, AxC, AxD, BxC, BxD e CxD.

Podemos observar pela Fig. 14 que a reatividade dos animais à CRRG subplantar é baixa porém os volumes de edema se mantêm estritamente proporcionais às concentrações do flogógeno. Findo o experimento, os animais foram anestesiados pelo éter e sacrificados por secção dos vasos do pescoço, procedendo-se exame geral macroscópico das vísceras abdominais e torácicas. Ainda, comparando-se a curva D com os resultados homólogos das Fig. 10 e 11 por exemplo, podemos observar a grande variação na resposta edematógena à mesma dose (0,5mg) de CRRG, nesses três lotes de vinte animais.

Quando sucede, por razões próprias do animal, que a responsividade ao agente flogógeno esteja reduzida, o fenómeno é bastante homogêneo para aquele lote de animais, o que mostra a Figura 15. Com efeito, observamos que a dispersão dos valores em torno da média é pequena, embora a depressão geral das respostas seja notável. O coeficiente de variação (CV) (Ipsen & Feigel, 1970) a partir da segunda hora, está entre os valores 4 e 9.

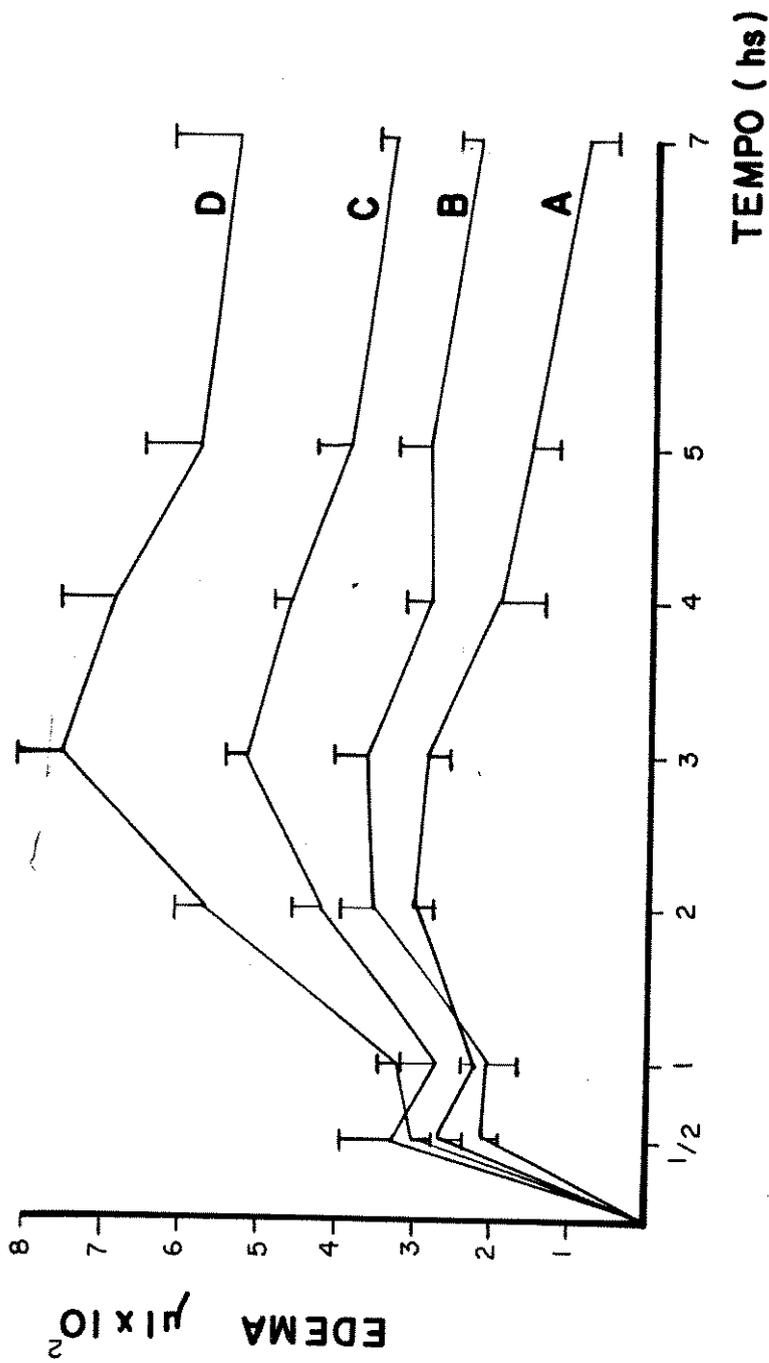


Fig.14 - Relações dose-resposta edematogênica à CRRG subplan-  
tar. Curva A, 0,05 mg. B, 0,1. C, 0,2 e D, 0,5.  
São significantes as diferenças: Ax C, Ax D, Bx D e  
CxD.

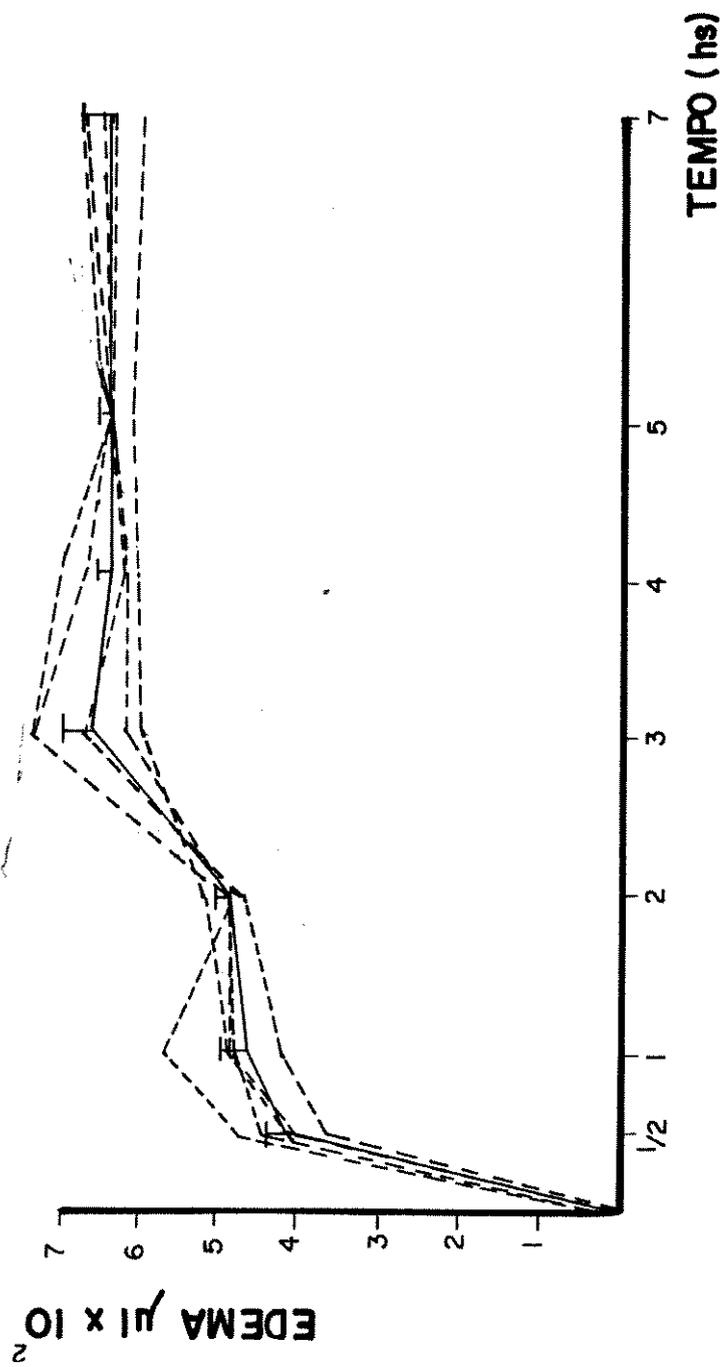


Fig. 15 - Edema produzido pela CRRG subplantar, 0,5 mg em 0,1 ml. As curvas pontilhadas são valores individuais para ressaltar a baixa variabilidade das respostas.

MODIFICAÇÕES DO EDEMA PELA CRRG PRODUZIDAS PELA  
ADMINISTRAÇÃO INTRAPERITONIAL DE VÁRIAS SUBSTÂNCIAS

TRATAMENTOS	DOSES mg/Kg	VARIAÇÃO % MÉDIA DO VOLUME DA PATA (N=5)		
		2hs	3hs	4hs
FORMOL	65	-39,7	-41,1	-32,5
HISTAMINA	0,5	-25,6	-31,1	-35,5
PAPAVÉRINA	0,037	-42,6	-48,8	-46,8
ÁCIDO ACÉTICO	0,6% 54,5	-17,3	-35,8	-23,6
	0,8% 70,8	-30,8	-40,2	-28,1
DEXTRAN 40	30	-31,9	-53,5	-43,2
	50	-12,6	-38,7	-33,0

Tabela 1 - Reune resultados de sete experimentos, cada um com vinte animais divididos em lotes/tratamento de 5 animais. Foram feitas três aplicações de 0,4ml (-1/2, 0 e 1/2h), à exceção do formol, 0,4ml, e do ácido acético, uma aplicação de 1ml, 1/2h. depois e -1/2h antes da CRRG, respectivamente.

Algumas das substâncias usadas nestes experimentos (ácidos, bases, polímeros e alcalóides) produzem edema quando aplicadas por via subplantar no rato. Administradas por via intraperitonal, em várias concentrações, produzem sistematicamente redução do edema de pata pela CRRG quer em machos quer em fêmeas cujo pesos médios variavam de 110 a 200g.

INFLUÊNCIA DA TETRACAÍNA SOBRE O EDEMA  
DE PATA PELA CRRG.

SEXO	PESO MÉDIO	TETRACAÍNA I.P. 1mg/Kg		
		2hs	3hs	4hs
♂	145g	-12,6	+12	+20
♂ ou ♀	135g	-18	-12,3	+14
♂ ou ♀	110g	-50	-41,2	-44
♀	110g	-43	-50,3	-37

Tabela 2 - Resultados de quatro experimentos mostrando a variação percentual do volume médio (N=5) das patas posteriores do rato após 2, 3 ou 4 horas da aplicação de tetracaína imediatamente seguida da CRRG.

A inibição produzida pela tetracaína (TTRC) em SF i.p. sobre a evolução do edema de pata pela CRRG em ratos é bem mais pronunciada nos animais mais jovens (110g). Os animais mais pesados ( $\bar{X}$  140g) apresentaram, além disso, uma evolução e recuperação do edema reduzidos, em relação aos demais.

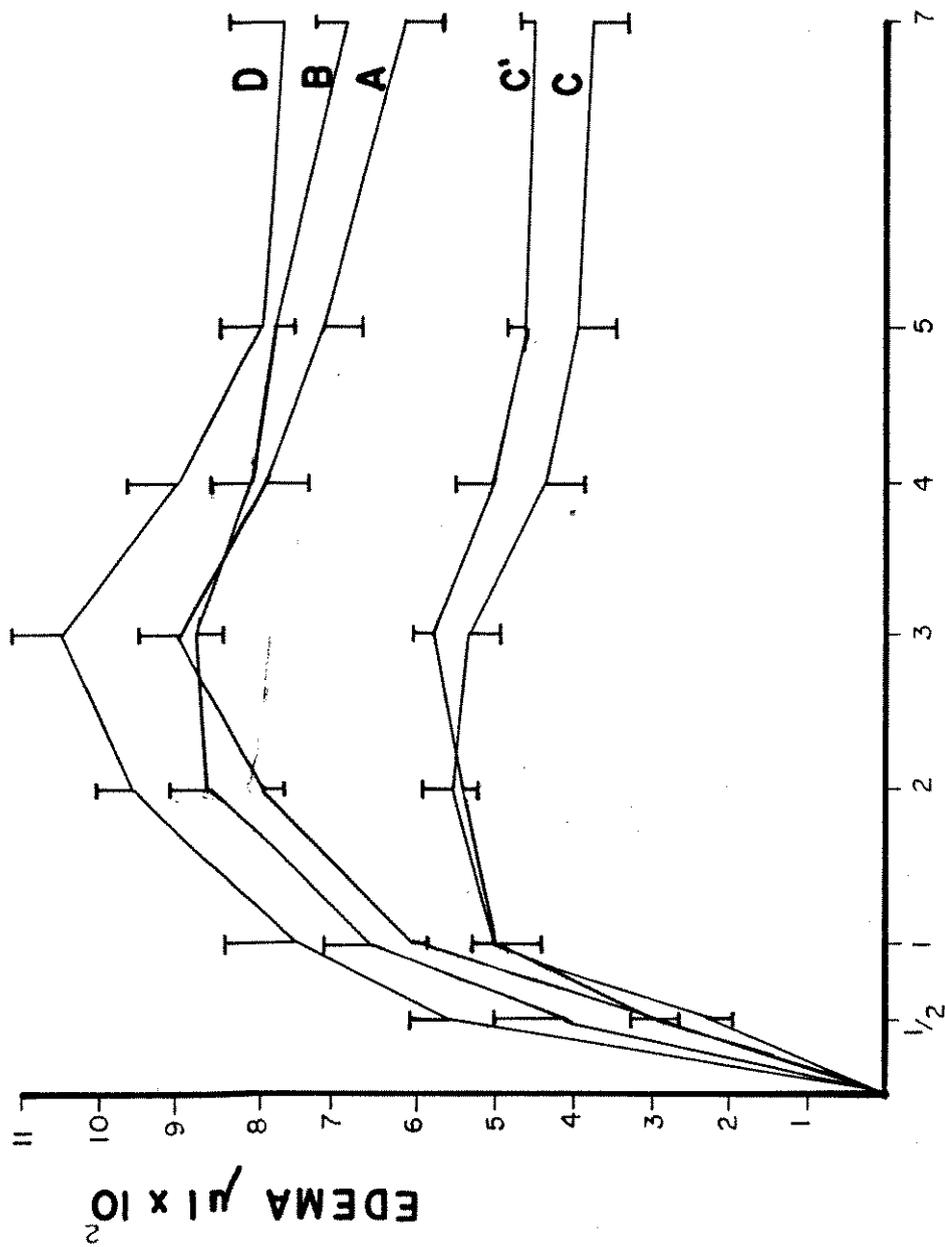
Esse experimento (Fig.16) demonstra de modo claro que a administração subplantar simultânea, em ambas patas de um mesmo animal, inibe drasticamente a resposta edematogênica. Aqui comparamos entre si, patas direitas de cinco animais que foram injetados apenas nesta pata, com as de outro cinco animais injetados em ambas as patas. Da mesma forma que não há diferença entre patas direita e esquerda do mesmo animal com edema em ambos os lados, o mesmo ocorre entre os edemas (significativamente maiores,  $P < 0,05$ ) de patas direita e esquerda, quando as aplicações são unilaterais.

Demonstramos, com o experimento mostrado na Fig. 17 que a administração de CRRG ( $4,5 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ) intraperitonealmente produz significativa inibição do edema (curva C) e que esse efeito é aditivo ao de uma segunda injeção do flogôgeno na pata contra-lateral (curvas D e D'). Neste último caso, a inibição é de quase 80% da resposta máxima atingida, na terceira hora. Podemos observar a igualdade de distribuição dos volumes de edema em ambas patas de um mesmo animal. Para respostas fortemente retraídas pela administração simultânea de CRRG a cinética de evolução do edema se modifica e verificamos que nas curvas C, B e B', o edema máximo não ocorre mais na terceira hora,

Administrada por via subcutânea na região dorsal próxima à inserção da cauda, (Fig.18) a CRRG (0,5mg em 0,1 ml) produz o mesmo grau de inibição do edema na pata direita que a injeção adicional de CRRG na pata contralateral. Essa inibição pode ser ainda aumentada, por meio da aplicação da mesma quantidade de CRRG, sendo a única diferença a

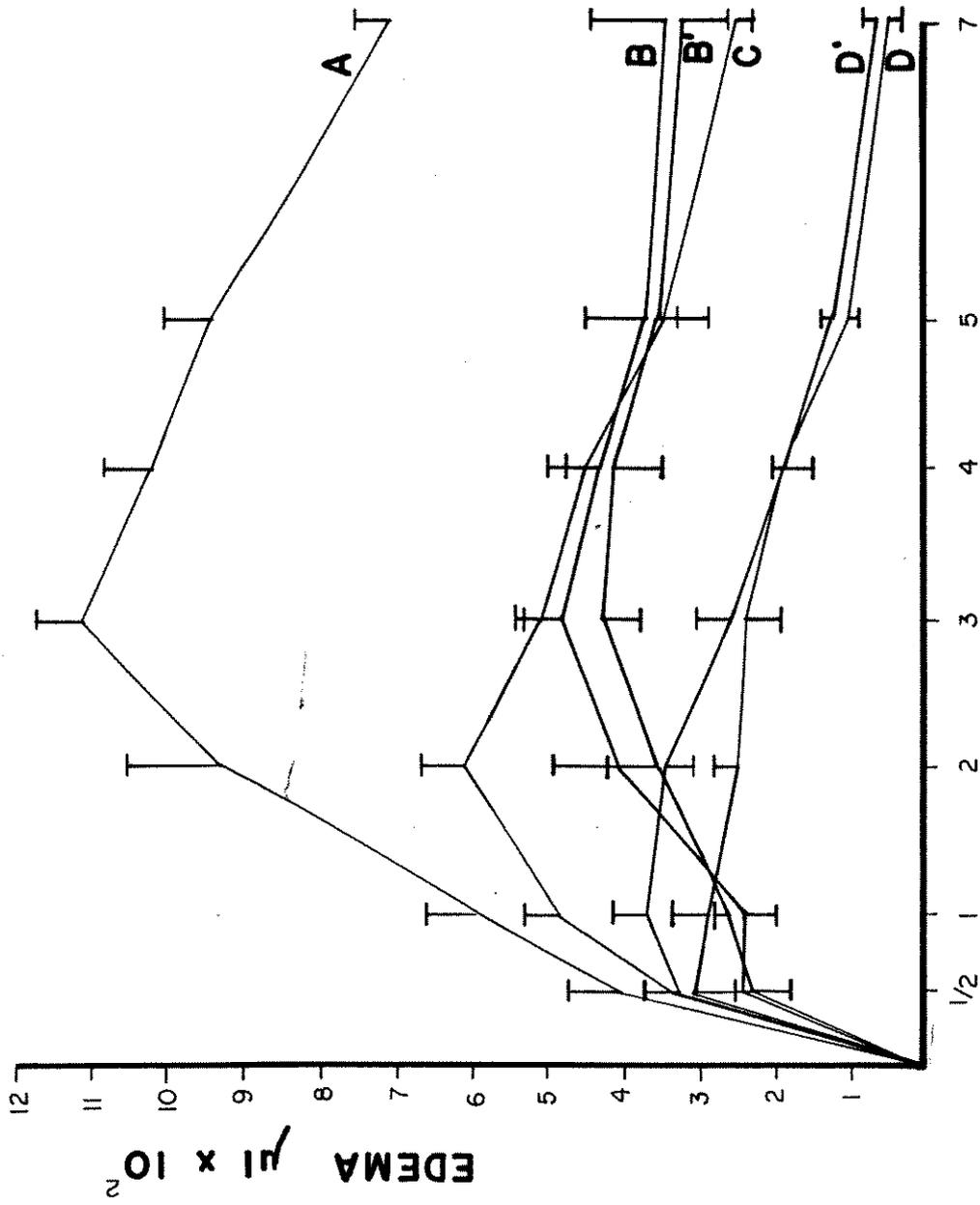
redução pela metade, da distância entre as duas injeções subplantares e dorsal. Embora a resposta edematogena seja constantemente maior, a diferença não é estatisticamente significativa, na maior parte do tempo.

Ratos machos, adrenalectomizados quatro dias antes do teste com CRRG apresentam resposta edematogena significativamente maior que seus homólogos com operação simulada. É o que mostra a Fig.19. Podemos verificar também que adrenalectomia reduz significativamente mas não abole o fenômeno de inibição do edema causado por uma segunda administração do agente inflamatório (linhas B e D). Comparando-se, entretanto, as curvas D com A constatamos que não há diferença entre os edemas provocados pela CRRG nos ratos com adrenalectomia simulada e nos tratados bilateralmente com a CRRG.



### TEMPO (hs)

Fig. 16 - Demonstração das respostas edematógenas quando a CRRG foi simultaneamente injetada em ambas as patas. Grupo A, CRRG na pata direita (d) (controle). B, CRRG na pata esquerda (e) (controle). C e C' volumes do edema nas patas d e e respectivamente, sendo a CRRG administrada em ambas as patas simultaneamente. Em D, resposta à CRRG suspensa em água (pata direita). São significantes as diferenças ( $P < 0,05$ ): AxC, AxD, AxC', BxD, BxC', DxC', DxC, e BxC.



**TEMPO (hs)**

Fig. 17 - Efeito da administração simultânea de CRRG em ambas as patas. CRRG (0,5mg em 0,1ml) nas patas posteriores direitas de todos os animais. Curva A, controle. B, B' administração simultânea na pata esquerda. C. administração simultânea i.p. (4,5mg.Kg<sup>-1</sup>) e D, D', CRRG em ambas as patas e por via i.p. Cada curva foi comparada a todas as outras, mostrando - se significantes (P < 0,05), exceto para BxB', DxD', B'xC e BxC.

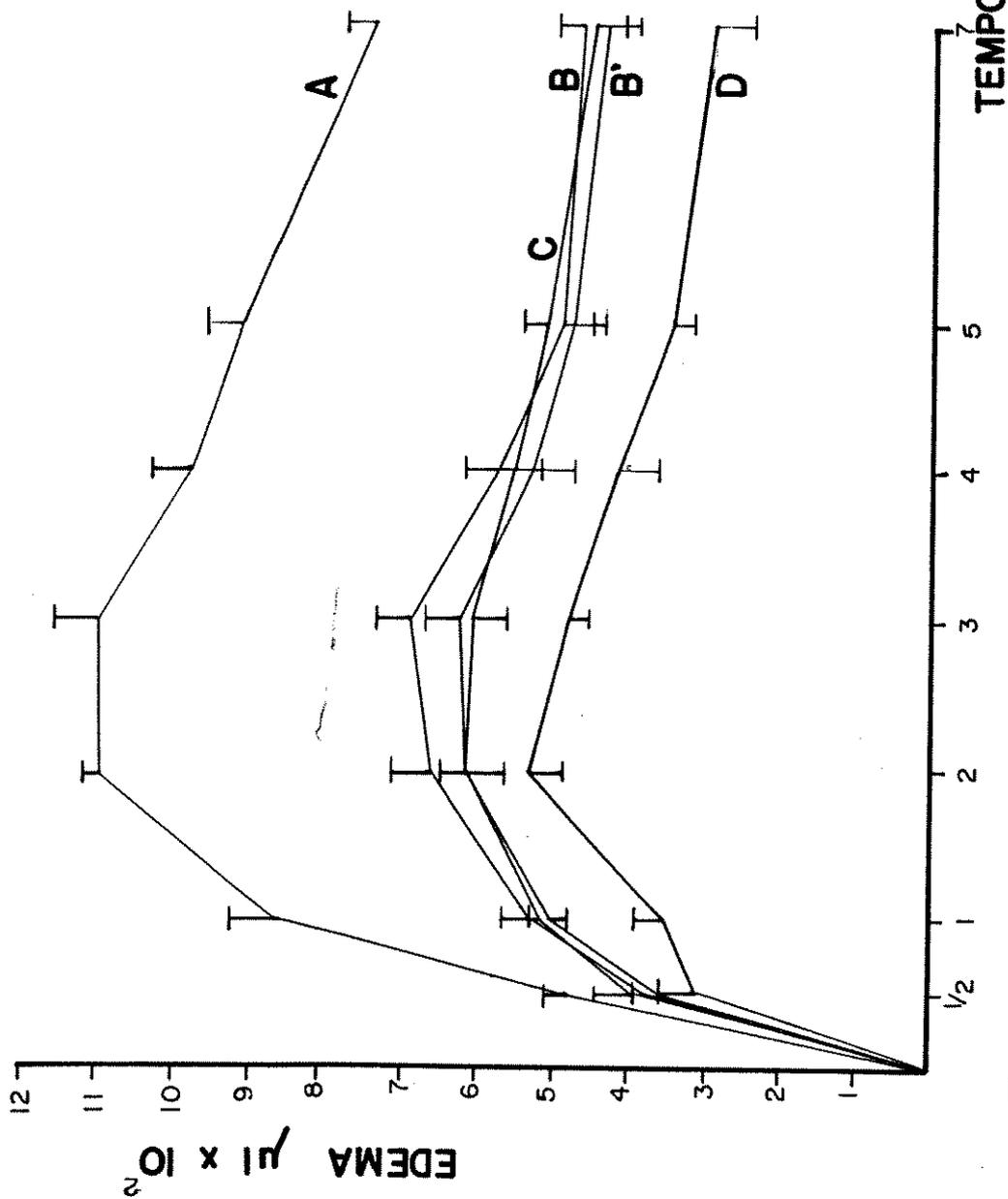


Fig. 18 - Efeito da administração simultânea de CRRG sobre o edema de pata direita (ponto 1). Administração de CRRG s.p. direita ( 0,5 mg em 0,1 ml) em todos os animais. Curva A, controle. B, B' administração simultânea na pata esquerda. C, administração simultânea subcutânea (CRRG 0,5 mg) ponto 2 (dorsal próximo a inserção da cauda) e D, administração simultânea a meia distância entre os pontos 1 e 2. São significantes as diferenças: AxB, AxB', AxC, AxD, BxD e B'xD.

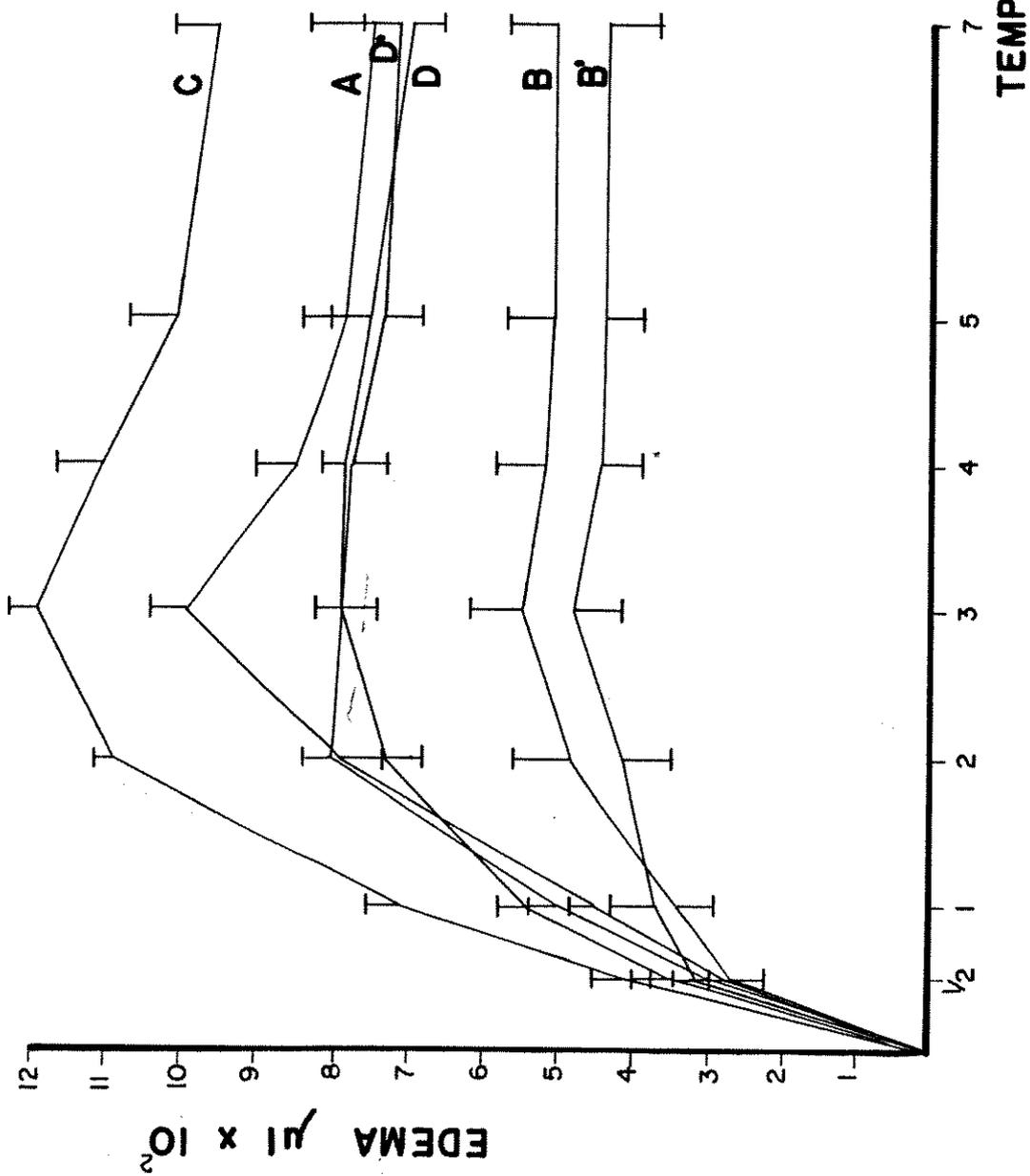


Fig. 19 - Influência da adrenalectomia ("adrenex") sobre o efeito da administração simultânea de CRRG em ambas as patas. Em A, animal com operação simulada ("Sham") injetados com CRRG na pata direita. B, B' "sham" com CRRG em ambas as patas. C, "adrenex" com CRRG na pata direita e D, D' "adrenex" com CRRG nas duas patas. As diferenças entre as curvas são significantes exceto para: AxD, AxD', BxB' e Dx D'.

Estudamos em seguida o efeito da aplicação subplantar bilateral simultânea de CRRG porém com doses diferentes.

Inicialmente fixamos a dose de 0,5mg de CRRG na pata direita variando em cada grupo e quantidade aplicada na pata contralateral, zero, grupo A; 0,1mg, grupo B; 0,2mg nos animais do grupo C; 1mg, grupo D; 1,5 para o grupo E. Os resultados estão apresentados na Fig. 20 e sob forma diagrama de barras (Fig. 20A). Pode se apreciar com clareza que os volumes de edema à dose padrão de 0,5mg sofrem inibições proporcionais às doses aplicadas nas patas opostas. Por sua vez as doses de 0,1, 0,2, 1,0 e 1,5mg dão respostas proporcionais conquanto estejam concomitantemente inibidas. Observamos, por exemplo, que a resposta E está fortemente inibida pelo estímulo (1,5mg) na pata oposta (E'). Por sua vez esta última (E') é significativamente menor que o padrão (A) de apenas 0,5mg porém sem a inibição contralateral. As curvas B' e C' não diferem entre si, mostram-se inibidas até um ponto provavelmente máximo, considerando-se o volume de 0,1ml administrado. Observamos também que a maioria das curvas não apresenta valor máximo na terceira hora.

No diagrama de barras observamos que o edema produzido por 0,5mg nos primeiros trinta minutos já sofre influência, inibidora ainda que limitada, das doses crescentes de CRRG na pata oposta, mas que o efeito de 0,1mg é quase nulo. Só a partir de 1,0mg na pata esquerda começa a predominar o edema nesta pata.

Os valores de edema correspondentes a 1,5, 1,0, 0,2 e 0,1mg, sem interferência de uma segunda aplicação, po-

dem ser apreciados na Figura 21 e diagrama de barras 21A. Podemos observar que eles são essencialmente os mesmos até os trinta minutos iniciais, quando então passam a ser diretamente proporcionais às doses. A velocidade de acúmulo de fluido nas patas, é claramente visível nas diferentes inclinações das curvas, entre primeira e segunda horas, tal como se observa na pequena figura inserida. Como sempre ocorre nessas condições, o pico do edema se estabelece em torno da terceira hora, enquanto que a diminuição do volume até a sétima hora segue trajeto aproximadamente paralelo e, nesse tempo, o volume reabsorvido é muito pequeno em relação a cada valor máximo. Podemos observar pelo diagrama de barras (Fig. 21A) correspondente ao mesmo experimento a assimetria dos pontos máximos atingidos antes da terceira hora, e da terceira à sétima, indicando que a reabsorção do fluido realmente não é proporcional ao volume de pata.

As medidas dos volumes das patas (sem qualquer tratamento) mostram, para as doses de 1,0 e 1,5mg (patas esquerdas) uma retração que se prolonga pelo menos até a sétima hora (Fig. 21). É significativo que nos dez animais cujas patas direitas foram medidas, todos exibiram essa retração de volume, cujo significado será abordado na discussão.

Do diagrama de barras correspondente pode se verificar que o edema nos primeiros trinta minutos é essencialmente o mesmo com doses de CRRG tão diversas quanto as de 0,1, 0,2 e 1,0mg.

Dada a impossibilidade de trabalharmos com grupos maiores que vinte animais de cada vez (geralmente quatro lotes de cinco animais) obtivemos resultados significativos

mostrando a grande variação de responsividade que pode ocorrer entre "partidas" diferentes de animais. A resposta de 0,5mg de CRRG foi tão grande quanto a obtida com 1,0mg no lote seguinte, como se observa comparando-se os dois diagramas de barras.

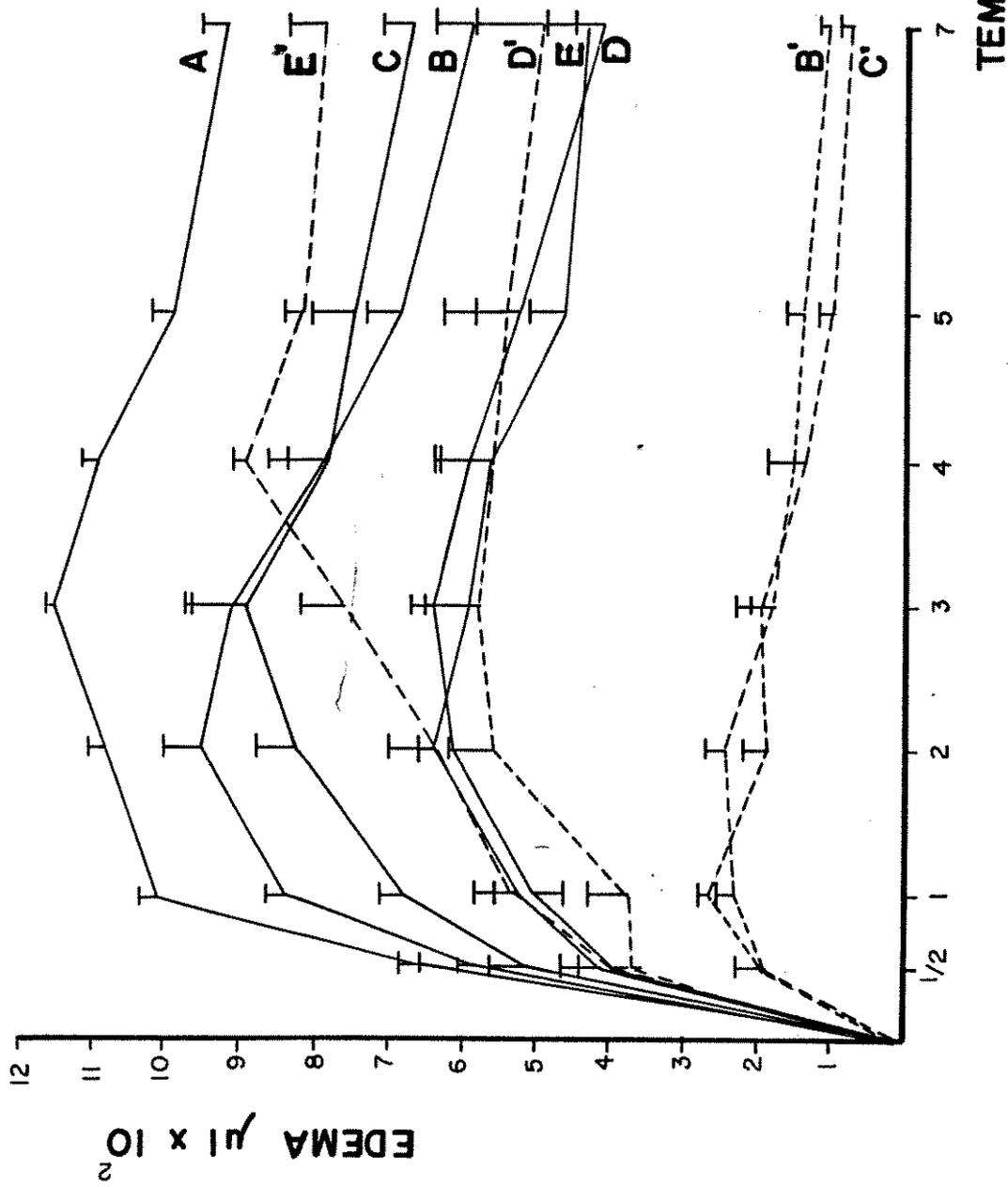


Fig. 20 - Efeito da CRRG administrada simultaneamente em ambas as patas. CRRG 0,5 mg em 0,1 ml administrada nas patas direitas de todos os animais (A, B, C, D, E). Curva A, controle. B', C', D' e E' administração simultânea na pata esquerda 0,1 mg., 0,2 mg., 1 mg. e 1,5 mg respectivamente. Todas as curvas foram comparadas entre si e as diferenças são significativas ( $P < 0,05$ ) exatamente para: B'xC', DxD', CxB, CxE', DxE e D'xE.

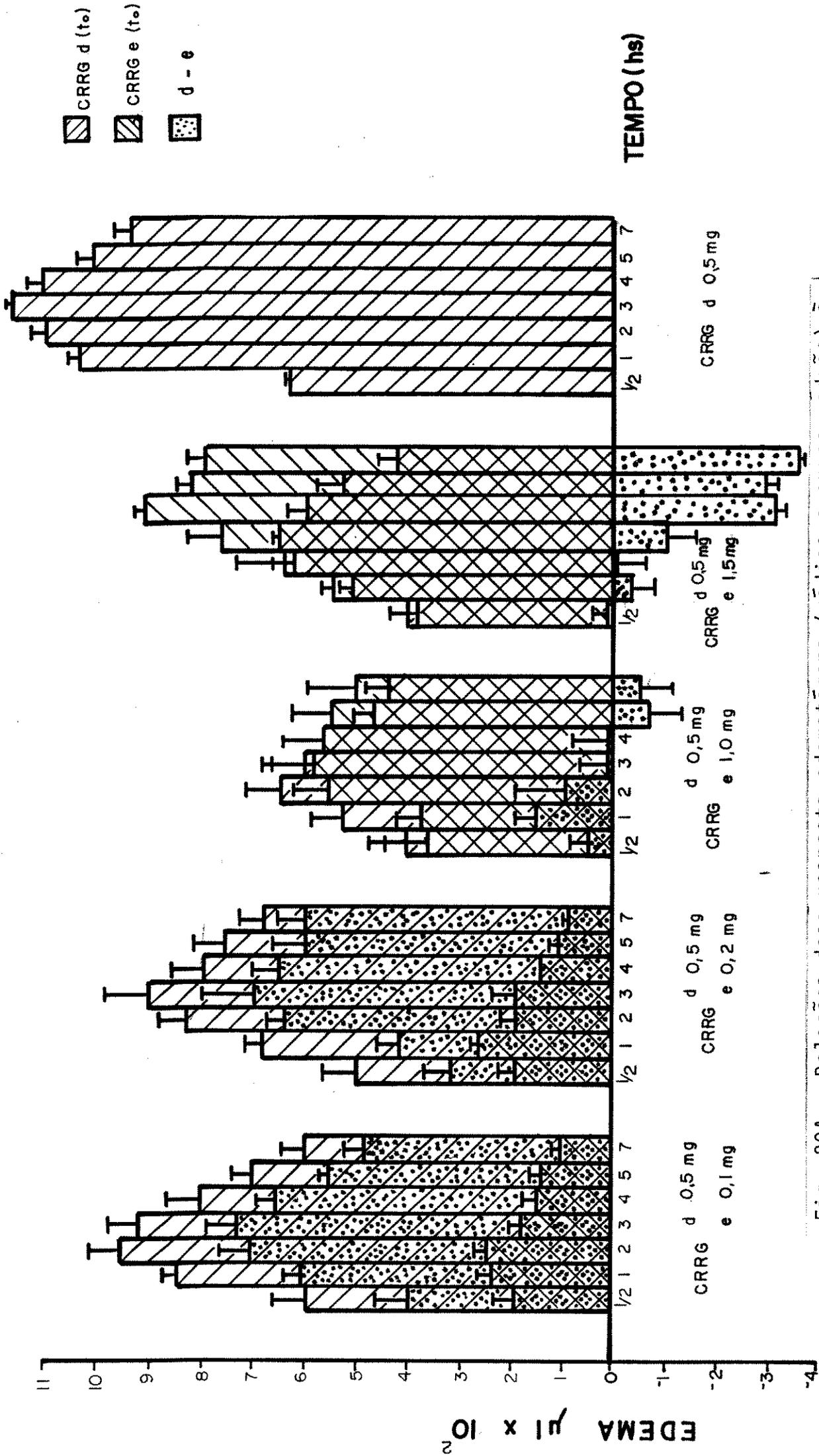


Fig. 20A - Relações dose-resposta edematogena (médias e erros-padrão) à CRRG subplantar (0,1 ml), nas doses indicadas, em ambas as patas (d) e (e), medida após 1/2, 1, 2, 3, 4, 5 e 7 horas da injeção de flogôgeno. Os valores negativos da diferença d-e foram convencionalmente mostrados como edema "negativo".

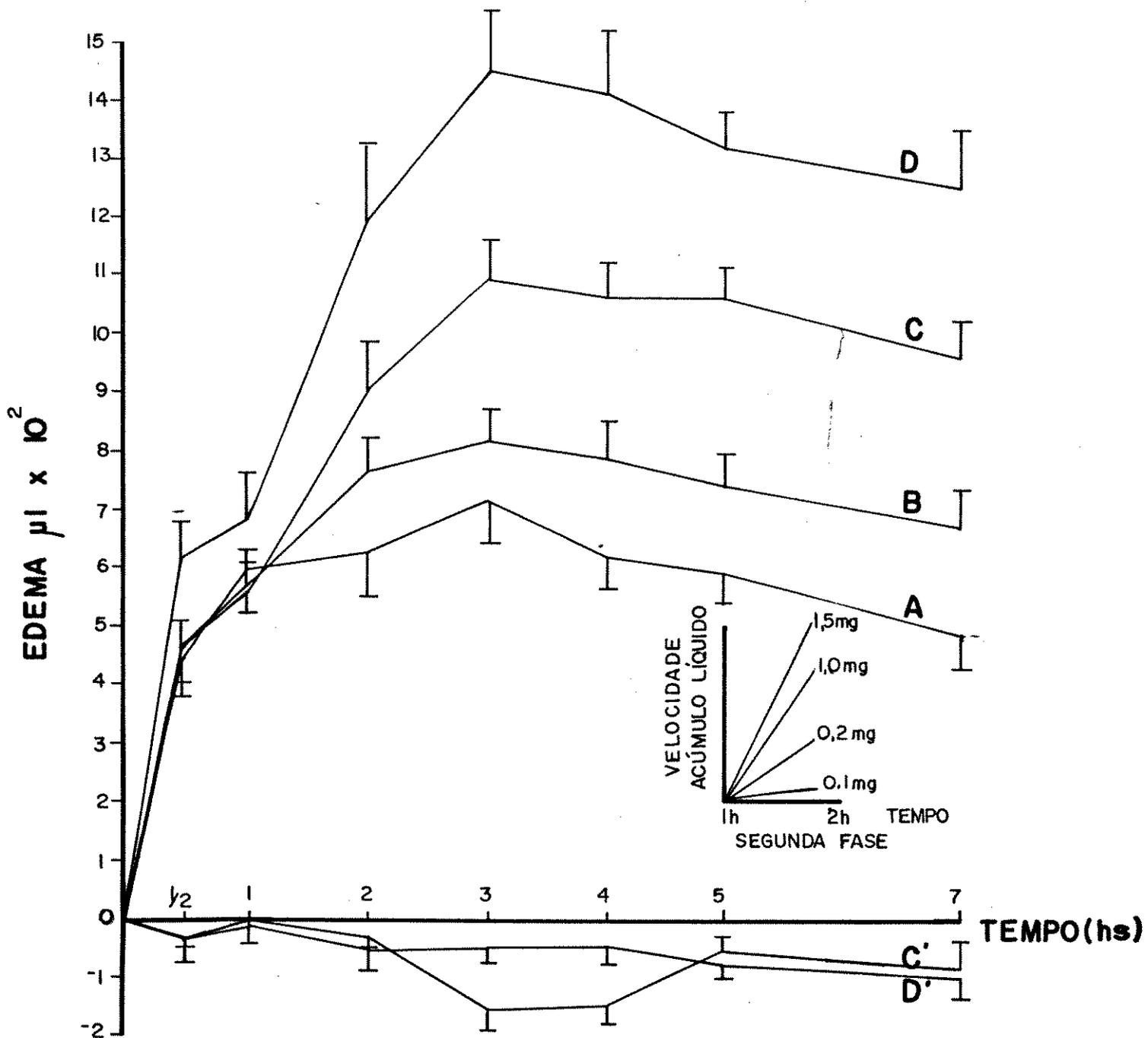


Fig. 21 - Relação dose-resposta edematôgena à CRRG. Cada cinco animais recebeu injeção subplantar de 0,1 ml de suspensão de CRRG 0,1 mg (grupo A), 0,2 mg (grupo B), 1 mg (grupo C) e 1,5 (grupo D). A partir da 2ª hora, e são então, são significantes as diferenças Ax C, Ax D, Bx D e Cx D. Abaixo da ordenada zero estão os valores relativos do volume das patas contralaterais, grupos C (C') e D (D'). Inserto: em destaque, a estrita proporcionalidade entre concentração do flogôgeno e a velocidade de acúmulo de líquido no período indicado.

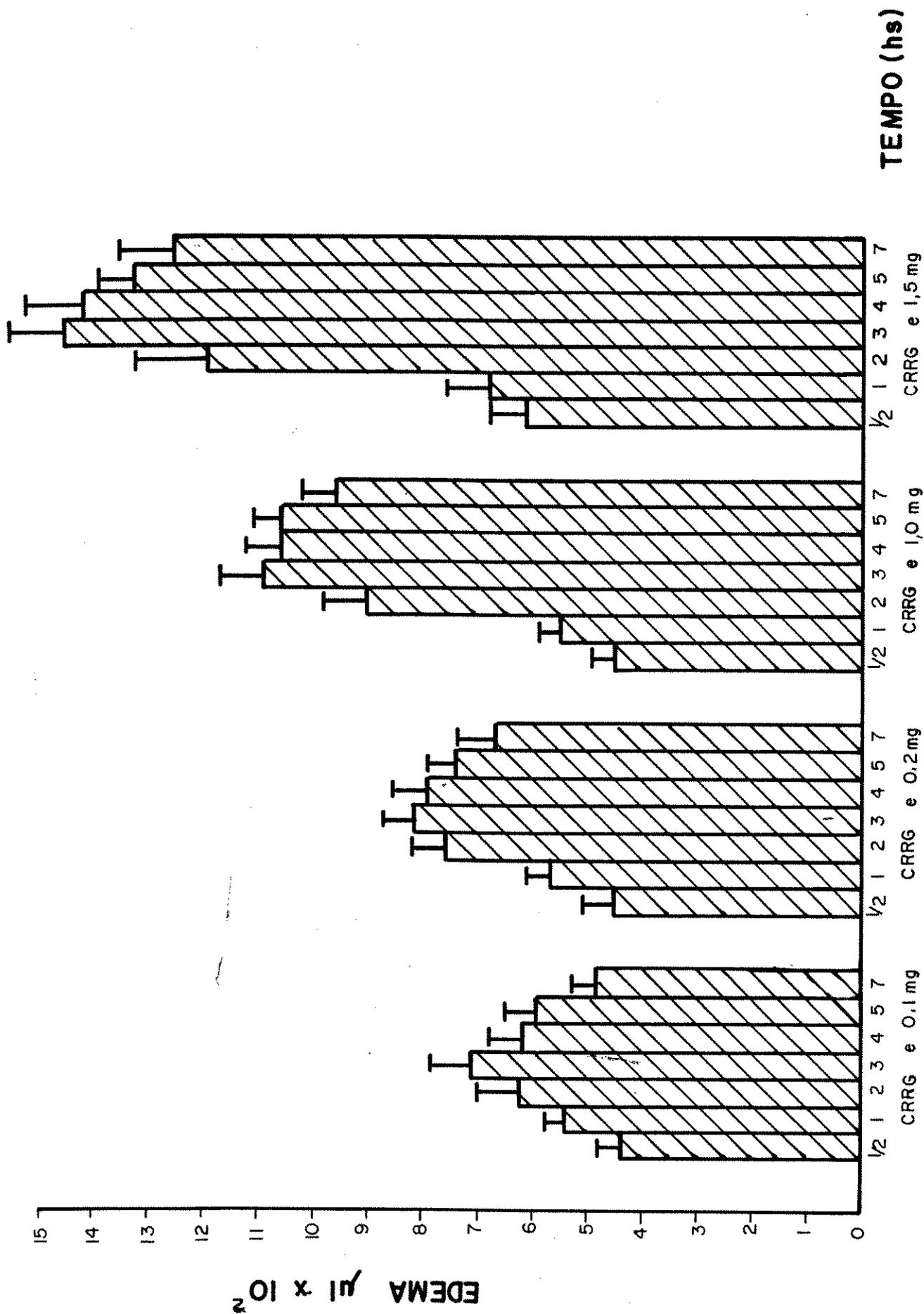


Fig. 21A - Relações dose-resposta edematogena (médias e erros-padrão) à CRRG administrada (0,1 ml) na pata posterior esquerda de ratos.

Baseados nos resultados obtidos (Fig. 21), realizamos um novo modelo de experimento no qual oito ratos foram injetados por via subplantar (sõ as patas esquerdas) com 1,0mg de CRRG, em 0,1ml de SF, e um animal do mesmo lote foi mantido nas mesmas condições sem tratamento algum. Realizadas as pletismografias dos 30 minutos e da 1a. hora, três desses animais foram cuidadosamente contidos e com a pata sob a lupa, conforme já descrito, coletou-se, durante aproximadamente trinta minutos, o exsudato que reflue espontaneamente pelo orifício de penetração da agulha. O material assim colhido por meio de pipeta Pasteur perfeitamente limpa e seca foi transferido para seringa de insulina (0,1ml) e imediatamente injetado por via subplantar naquele animal não tratado. A curva A da Fig. 22 mostra a evolução do edema médio em cinco animais. As curvas B e B' mostram respectivamente as variações de volume das patas esquerda e direita do animal receptor.

Podemos observar que o material injetado produziu imediatamente pequena reação edematôgena (linha B, Fig. 22), foi lentamente reabsorvido, completando essa reabsorção em duas horas. Observamos também que da 5a. à 7a. hora o volume dessa pata sofreu retração em relação ao valor controle.

Nesse mesmo animal, as sucessivas medições do volume da pata não tratada produzem resultados (curva B') mostrando que quase ao mesmo tempo em que o fluido exsudativo penetra na pata esquerda a pata direita sofre variação reductiva quase simétrica de volume, da qual se recupera lentamente. Adicionalmente a curva A', que representa os volumes

médios das patas direitas de cinco animais tratados pela CRRG, mostra redução de volume praticamente idêntica a do animal tratado com exsudato.

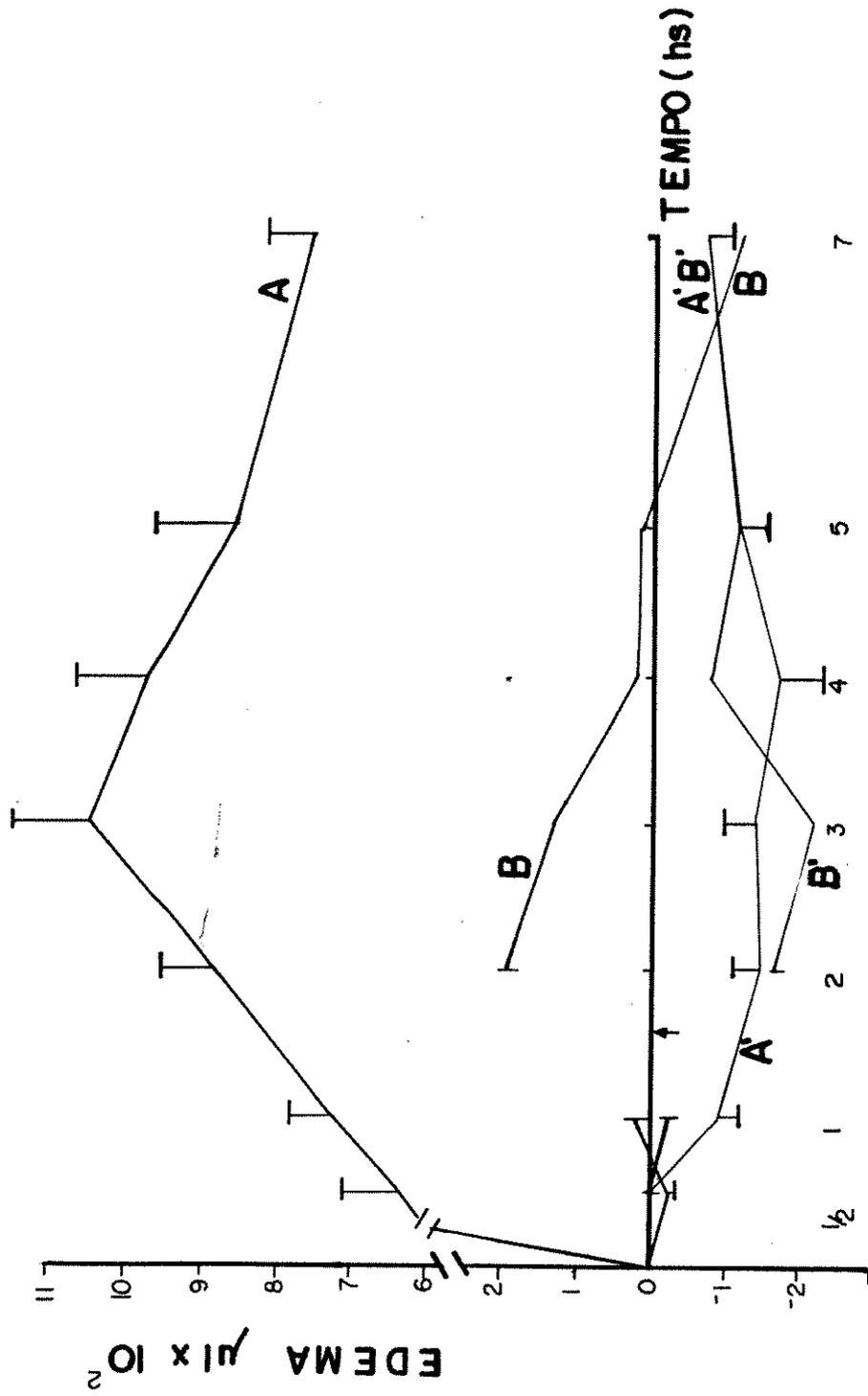


Fig. 22 - Edema produzido pela administração s.p. de CRRG 1 mg na pata esquerda de oito animais, Curva A, (valores médios de cinco ratos). A', medida do volume da pata esquerda de um único animal injetado subplantarmente com 0,1 ml de exsudato colhido de três (dentre oito do grupo A) animais. B', medida da pata contralateral. Detalhes no texto. A seta indica o momento da injeção do exsudato.

DISCUSSÃO

## DISCUSSÃO

Conquanto seja dos edemas experimentais provavelmente o mais amplamente utilizado, o edema provocado pela CRRG na pata posterior de ratos se mostra, ainda hoje, dentre os mais bem conhecidos e, um dos que mais carecem de estudos. Isso decorre de sua ampla utilização para análise de atividade anti-inflamatória, campo em que tem se mostrado útil, apesar das inconsistências importantes e numerosas em relação aos mecanismos envolvidos na sua gênese. Estes mecanismos, têm permitido fácil e repetidamente constatar sua complexidade face ao envolvimento de múltiplos fatores, donde as importantes discordâncias na literatura a esse respeito. O número de publicações nesta área é imenso. A maioria dos trabalhos associa ao edema experimental pela CRRG, substâncias de composição química e atividade biológica as mais diversas, com amplo predomínio dos assim chamados "anti-inflamatórios não esteróides" (AINE), dos antagonistas específicos de receptores de autacóides e catecolaminas, bem como de seus análogos funcionais. Ocorre ainda, que o estudo da atividade biológica desses compostos em relação ao processo inflamatório agudo revela também numerosos pontos obscuros. A maioria dos autores fez uso dessas substâncias, admitindo que atuem sobre os processos edemagênicos em evolução, unicamente e do mesmo modo como agem em outros sistemas biológicos.

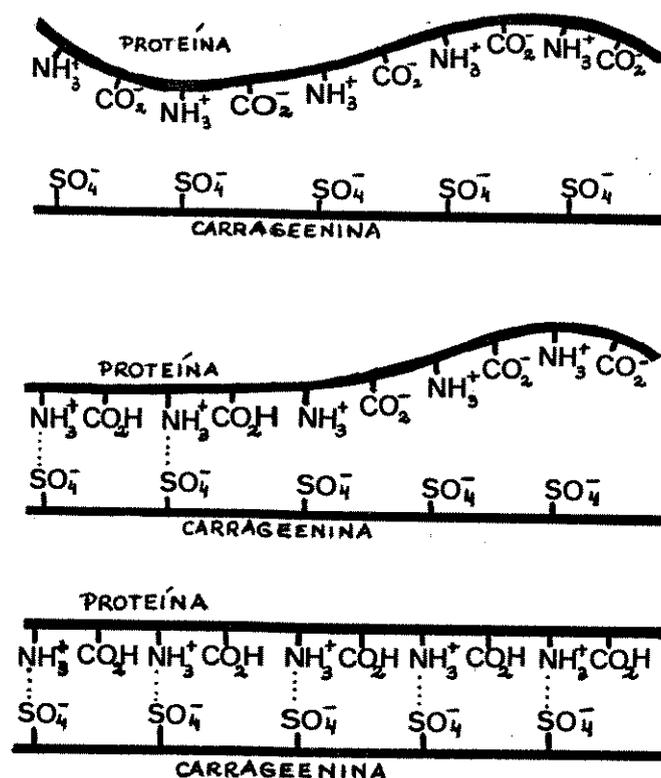
Decidimos, por essas razões, realizar uma análise experimental do edema e da contra-irritação pela CRRG sem interferência de outras substâncias exógenas objetivando co-

nhecer e re-conhecer as respostas endógenas cuja importância pode ser percebida através das numerosíssimas publicações a respeito, como se constata mais facilmente pelas citações nas revisões de Di Rosa(1972); Vinegar(1979); Thompson & Fowler(1981) e Garcia Leme(1981) para citar apenas algumas. Se introduzimos algumas poucas e variadas substâncias exógenas foi somente com a finalidade de salientar a inespecificidade do processo irritativo capaz de inibir o acúmulo de exsudato, em resposta à administração subplantar de CRRG no rato.

A sumária descrição que fizemos sobre o processamento industrial da carrageenina mostra a importância de se trabalhar sempre com material da mesma partida, pois até as amostras do mesmo laboratório são representadas por misturas elaboradas no sentido de preencher certas características físicas.

Havendo notado diferenças significativas entre os volumes de edema produzido pela mesma dose de CRRG suspensa em água destilada ou em soro fisiológico, determinamos a correlação inversa entre os volumes e a quantidade de NaCl na água destilada, até o ponto em que o solvente atinge valores próximos da isotonicidade. Quando ligeiramente hipertônico, já essa relação não se mantém.

A interação dos grupamentos reativos  $SO_4^-$  do polissacárido com proteínas teciduais pode ser representada tal como proposto por Guiseley e cols. (1980) para a influência recíproca poliânion-policátion (carrageenina-proteína) abaixo do ponto isoelétrico desta.



Esquema 2: Interação da molécula de CRRG com a proteína tecidual.

A reatividade química das carrageeninas se deve primariamente aos grupos sulfato-ésteres que são fortemente aniônicos, comparáveis, a esse respeito, ao ácido sulfúrico. Mas as carrageeninas comerciais são sais estáveis de sódio, potássio ou cálcio, com pesos moleculares médios na região dos 200.000 daltons (Davidson, 1980).

Sabemos que a intensidade do edema experimental inflamatório é função complexa de vários fatores, alguns ligados à espécie e ao tecido animal, e outros dependentes das moléculas das substâncias como por exemplo da sua reatividade, sua estabilidade química e biológica, seu peso molecu-

lar, características estas que se integram de modo complicado e pouco conhecido, para compor uma propriedade biológica que se poderia expressar como irritatividade ou flogogenidade, isto é, capacidade intrínseca de gerar reação inflamatória aguda em determinado sistema biológico. Essa propriedade pode ser extremamente acentuada em algumas substâncias vesicantes, com as quais a intensidade de resposta inflamatória pode ser desproporcionalmente alta em relação a quantidade aplicada e ao tempo de contato com o tecido vivo.

A adição de íons sódio à CRRG em solução, modifica, como constatamos empiricamente, a coleção de exsudato inflamatório no interstício. Aos fatores já citados, acrescenta-se a viscosidade da solução coloidal, que diminui com a adição do NaCl à água e que pode ser causa relevante da redução do volume do edema, uma vez que o tempo de permanência do flogógeno no local é diminuído.

No que concerne a ação contra-irritante do soro fisiológico ou da própria CRRG administrados por via intraperitoneal, é preciso considerar as características peculiares de estrutura e permeabilidade das cavidades serosas.

A absorção de líquidos ou suspensões destas cavidades em adultos, depende em grande parte dos movimentos respiratórios. Os linfáticos que drenam as cavidades serosas são facilmente penetráveis não só por soluções como também por partículas. Assim, após aplicação intraperitoneal de eritrócitos, células de leveduras, linfócitos, microsferas de vidro, células neoplásicas, partículas de carbono, estas podem ser prontamente observadas nos vasos linfáticos dia-

fragmáticos . À microscopia eletrônica, na maioria dos mamíferos (à exceção de ovinos, suínos e coelhos) observa-se um único e bem desenvolvido plexo imediatamente abaixo do peritônio, paralelo às fibras musculares, com fenestrações comunicando a cavidade peritoneal com o lúmen linfático (Allen, 1967).

Ao analisar os efeitos inibitórios da administração intraperitoneal de CRRG é preciso levar em conta que o próprio soro fisiológico, seu solvente, produz efeito anti-inflamatório, isto é, contra-irritante, cuja intensidade é dose-dependente (fig.03) ainda que sem o potencial irritativo da própria CRRG (curva D). Nossos resultados tornam provável que o efeito do SF por via intraperitoneal seja muito mais função da área atingida pela solução, nos volumes injetados, já que por via intravenosa essas quantidades são desprovidas de efeitos biológicos próprios do NaCl. A curva D inclui três vezes o volume de 0,4 ml cada uma delas com  $1,5 \text{ mg.kg}^{-1}$  de CRRG. Nessa mesma dose a CRRG também se mostra capaz de reduzir o edema de pata se administrada na cavidade peritoneal, dependente da área da superfície atingida (fig.05, linhas B, C e D) já que o volume e não a quantidade do polissacárido se mostra crítico.

Pode-se observar que quando se testa uma substância com propriedades anti-inflamatórias dissolvendo-a em SF ou outro solvente e, a seguir, injetando-a por via intraperitoneal, parte substancial de seu efeito pode decorrer da ação inespecífica do veículo, que será, em certas condições, tão intensa quanto por exemplo da própria indometacina

(fig.06, linhas C e D). Nesta circunstância, e também por via I.V., participa um outro componente, também inespecífico, representado pela agressão da administração intravenosa na cauda do animal não anestesiado. Aqui não se trata de contra-irritação, mas de fenômeno de ativação neuro-endócrina, cuja distinção é fundamental, em relação a mecanismos meramente contra-irritativos. A fig.19 ilustra bem esse fato. A simples presença e funcionamento normal das adrenais, elemento efetuator chave nas reações do "stress", mantém a resposta edematogena (nas nossas condições experimentais) em nível significativamente, mais baixo do que em ausência de adrenais. O mesmo fenômeno de contra-irritação pode ser facilmente demonstrado após administração "per os" do irritante, o que foi descrito inicialmente por Winternitz, em 1901. Também no edema pelo dextran a reação edematogena é grandemente aumentada nos animais adrenalectomizados (Calignano e cols., 1985).

Injeções simultâneas de CRRG subplantar bilaterais, em animais adrenalectomizados confrontados com os "sham" operados nas mesmas condições, mostram claramente que o fenômeno da contra-irritação existe no animal adrenalectomizado, e que ambos componentes endócrino e não endócrino, podem ser convenientemente distinguidos, por ser, no animal íntegro, a resultante inibitória de contra-irritação significativamente maior do que em ausência de adrenais.

Parece, no geral, que independentemente do agente flogogeno, hormônios cortico-adrenais, em condição basal, exercem continuamente atividade moderadora sobre respostas edemagênicas a polímeros. A extensão dessas observações pa

ra outros irritantes é desejável.

Quando provocamos um processo inflamatório típico, com as características agudas da reação à dose fixa de CRRG (vide fig.20), podemos observar as modificações que ocorrem nos animais de experimentação sobre as dimensões do edema, a cinética da reação edematosa na pata, quando se provoca simultaneamente no membro oposto, processo irritativo de intensidade variada. Foi o que fizemos em grupos de cinco animais. Observamos então que, na situação mais simples, conquanto ideal, que quando a estimulação provocada é de baixa intensidade, ela própria produz reação significativamente menor do que em ausência da inflamação concomitante, ao mesmo tempo em que reduz significativamente o processo inicial, qualquer que seja sua intensidade. Essa redução ocorre sistematicamente, ainda que em animais adrenalectomizados, conforme demonstramos de modo direto.

Em animais íntegros, admitimos que todas as respostas edemagênicas à CRRG sejam portanto menores, isto é, parcialmente moderadas, já por influência endócrina (fig.19). Pode-se perceber, a enorme importância desses estudos sobre a influência recíproca de processos reacionais agudos, observando-se que um estímulo flogôgeno de intensidade seguramente supra-máxima, por exemplo administração subplantar de 1,5 mg de CRRG, quando a reação correspondente será ainda significativamente inferior a um terço dessa dose, se coexiste com processo semelhante, provocado por 0,5 mg da mesma substância a qual por sua vez, provocará uma resposta edematogênica enormemente retraída (fig.20).

Aqui pode-se observar também (fig.20) que dentro de determinados limites, doses totais crescentes de CRRG produzem edemas totais proporcionalmente menores. Assim também, quando essas doses forem divididas e aplicadas, cada fração em uma das patas, produzem volume total de edema, isto é, a soma dos acréscimos de volumes de ambas as patas, significativamente menor do que aquele provocado por 0,5 mg em uma só pata. Portanto esse experimento mostra também que a inibição do edema inflamatório da CRRG causado por contra-irritação envolve mecanismo saturável, dose-dependente.

Se o estímulo flogógeno é duplo, seu efeito é aditivo, do que resulta menor edema total. Assim, uma administração intraperitoneal da própria CRRG reduz (fig.17, linha C) significativamente o edema de pata pela mesma substância. Se entretanto realizarmos uma terceira ou várias outras aplicações do polímero, manifesta-se redução adicional sobre a anterior, com diferença estatisticamente significativa (fig. 17, linhas D e D'). Confrontando agora, na mesma figura(17) as linhas A e D observamos que o efeito acumulado da contra-irritação perfaz redução de 78% no volume do edema na terceira hora e nada menos que 93% na sétima hora. Por outro lado, não há diferença entre o efeito anti-inflamatório produzido pela irritação provocada por uma segunda aplicação de CRRG subplantar contra-lateral ou de idêntica aplicação feita por via subcutânea na região dorsal próxima da inserção da cauda, como mostramos na fig.18, linhas B B' x C.

Ao longo de vários anos trabalhando com a mesma amostra de CRRG, injetando-a na pata posterior de ratos Wistar, acumulamos um número de observações que nos permiti-

te facilmente detectar em amostras, por exemplo, de cinco animais, tomadas de uma determinada população, através da resposta a uma dose padrão, até a terceira hora, se estes animais se encontram ou não em condições adequadas para estudos dessa natureza. Quando isso ocorre, a resposta edematogênica à CRRG atinge facilmente os 850 ul com 0,2 mg (fig.21, linha B) ou 1150 ul com 0,5 mg (fig.09, linha B). Entretanto a simples administração de pequeno volume de SF por via i.p. já produz inibição do edema (fig.09, linhas C e D; fig.18, linha D). Não foi difícil suspeitar que as respostas significativamente menores deveriam decorrer de processos reacionais patológicos, subclínicos ou não. Animais com essas características respondem com edema reduzido, embora mantenham a dependência em relação a dose, como mostra a fig.14. À necropsia todos os vinte animais apresentavam processos inflamatórios agudos localizados principalmente nos pulmões e intestinos.

A inespecificidade dos fatores capazes de inibir a reação edematogênica experimental foi amplamente confirmada aqui e nos permite crer que processos reacionais endógenos, de mais variada natureza influenciam do mesmo modo a inflamação aguda à CRRG.

Nesse contexto é oportuno transcrever as considerações de Vinegar: "Quando se usam ratos, eles devem estar livres tanto de pneumonias agudas ou sub-agudas que pervadem muitas colônias de criações comerciais..." e a seguir: "o desenvolvimento da inflamação e concomitante hiperalgesia estão diminuídos em relação aos animais saudáveis" (Vinegar, 1979).

Hã, portanto, que se considerar um "status" inflamatório do animal, incluindo-se aqui a totalidade dos processos reacionais aparentes ou não a patógenos de todos os tipos, microorganismos, parasitas, além de agressores químicos ou físicos.

Os resultados na fig.15 mostram, de modo mais claro, que em uma amostra de cinco animais, a inibição da resposta edematosa é notadamente homogênea o que leva a crer na natureza epidêmica do processo que os envolve.

Quando a capacidade de acumulação do exsudato é sub-máxima, como acontece com a dose de 0,5 mg de CRRG em a n i m a i s sem edema retraído (por exemplo, dados da fig.09), a passagem de irritante na cavidade peritoneal reduz significativamente o edema. Com o aumento do estímulo flogógeno p a r a n í v e i s m á x i m o s, a mesma estimulação peritoneal parece ser menos eficaz no bloqueio do edema de pata. Podemos observar aqui a importância da qualidade dos animais de experimentação, já que se torna imprevisível a resposta edemagênica ã C R R G, face a processos inflamatórios internos, aparentes ou não.

Quando esse segundo estímulo é de intensidade moderada, porém repetitivo, mecanismos endócrinos são acionados. Assim, a injeção real ou simulada de SF tanto por via subcutânea como intraperitoneal reduz significativamente a resposta edemagênica ã C R R G, como mostram os experimentos correspondentes às figs.10, 11, 12 e 13. Estas duas ú l t i m a s, mostram também a associação aditiva de contra irritação química (CRRG ou SF) com a agressão da imobilização e jejum, que solicitam mecanismos neuro-endócrinos moderado-

res do edema inflamatório, ou que o inibem por completo.

O fenômeno, bem como o uso terapêutico da contra-irritação como recurso anti-inflamatório, são antigos, a ponto de não podermos situá-los adequadamente no tempo. Os mecanismos envolvidos, bem como os numerosos detalhes necessários a sua adequada utilização vêm sendo lentamente desvendados. Sabe-se que efeitos contra-irritantes persistem em animais adrenalectomizados e hipofisectomizados (Robinson & Robson, 1964). Um dos seus aspectos mais importantes, diz respeito às intensidades: do processo inflamatório que se quer suprimir, e da irritação que se deve produzir para alcançar esse objetivo terapêutico.

Em nossas condições experimentais equivaleria a determinar quais doses de CRRG se deveriam usar para obter inibição da inflamação produzida por processo edematógeno padrão, por exemplo o produzido por 0,5 mg do mesmo composto.

A participação de hormônios do adrenocortex sobre a resposta edemagênica à CRRG decorre, a nosso ver, não da estimulação do eixo hipotálamo-adrenal mas, para estímulos de baixa intensidade, as respostas estão ligeiramente diminuídas (fig.19, linha C) sob influência de níveis fisiológicos da corticosterona, principal glicocorticoide no rato, que conhecem uma flutuação circadiana (Bonta, 1978). Demonstramos que animais adrenalectomizados quando sob efeito da CRRG subplantar mostram-se significativamente diferentes conforme tenham recebido uma ou duas administrações simultâneas (linhas C x D D'). O mesmo fenômeno ocorre com os ratos dos grupos A x B B'. Na comparação entre os ede-

mas dos animais adrenalectomizados, com duas injeções simultâneas de CRRG, verificamos que a diferença altamente significativa decorre da facilitação do edema, por igual, em ambas as patas no grupo de adrenalectomizados.

Essa redução demonstrada de reatividade inflamatória pelo glicocorticosteróide basal (fig.09) faz parte, como dissemos, dos eventos moderadores "fisiológicos" da própria inflamação, analogamente, por exemplo à ativação de alfa receptores adrenérgicos pré-sinápticos que moderam a liberação de noradrenalina nas neuroterminais.

É de importância fundamental a distinção entre os fenômenos neuro-endócrinos de reação à agressão externa, dos fenômenos inflamatórios bem localizados que também se mostram capazes de inibição do edema pela CRRG. Se compararmos nossos resultados ilustrados na fig.19 com os das figs.06 e 07 podemos concluir pela participação de ambos componentes nessas três condições experimentais. Observamos, confirmando vários trabalhos anteriores (Laden e cols., 1958; Jori & Bernardi, 1966; Goldstein e cols., 1967; Atkinson e cols., 1971) que não só a reação originada na cavidade peritoneal é inibitória (figs.06 e 07) como também por via venosa (fig.07, linha D), sendo significativamente maior a diferença por esta última via. Nossos resultados com três extratos de diferentes vegetais mostram que o fenômeno é inteiramente inespecífico, o que é fartamente corroborado pelos resultados obtidos com substâncias dos mais variados grupos farmacológicos e estrutura química como sejam a tetracaína (tabela 2), o ácido acético, a histamina, a pa

paverina, o formol e o dextran (tabela 1).

Uma vez no interstício, o exsudato que se coleta na pata de ratos por ação da CRRG provoca aumento de pressão coloidosmótica no local o que resulta afluxo de líquido, que, por sua vez, tende a diluir o material proteico inicial. O retorno desse material para a corrente circulatória se faz significativamente, apenas através dos vasos linfáticos (Casley-Smith, 1985; Hurley, 1978; Nicoll & Taylor, 1977).

Durante a fase aguda do edema pela CRRG, a redução de volume que demonstramos ocorrer no membro oposto ao que recebeu o flogógeno é portanto consequência da alteração da captação linfática (figs. 20 e 21).

No membro injetado com CRRG, esta atividade está presente sendo lícito afirmarmos que aqui, o volume do edema é, cada instante, a soma algébrica, de pelo menos dois fatores antagônicos: o efluxo-estase e o influxo-mobilização linfática do exsudato.

A vantagem da metodologia por nós utilizada para demonstrar a atividade biológica acelerada da captação de líquido intersticial é, além da simplicidade, a de evitar o trauma da introdução de corpos estranhos ou substâncias químicas na intimidade dos tecidos. De fato, o fluído do edema emerge de modo espontâneo pelo mesmo trajeto da agulha quando da injeção do flogógeno. O material colhido pode ser usado imediatamente, não foi diluído por líquidos perfusores, supostamente fisiológicos, demonstra atividade biológica de intensidade compatível com o esperado, sem necessidade portanto de processamento químico para concentra-

ção do princípio ativo. Como se observa através da fig.22, a medida do volume da pata injetada com exsudato, feita vinte minutos depois, já mostra marcante efeito redutor sobre o volume da pata contralateral. Ao mesmo tempo revela que esse efeito é mascarado apenas inicialmente pelo volume do material injetado (linha B) que decai paulatinamente, atinge o valor inicial da pata normal, mas cuja ação se prolonga, reabsorvendo adicionalmente líquido intersticial, criando valores negativos que aumentam pelo menos até a sétima hora.

Esse fato mostra que, tão logo se acumula exsudato inflamatório como reação à CRRG injetada, se inicia o processo de aceleração da captação linfática.

Quando o edema pela CRRG não se mostra retraído, o que implica no uso de animais em boas condições de saúde, tal como ocorreu no experimento da fig.21, o acúmulo do exsudato até os trinta minutos não é dose-dependente, a partir de 0,1 mg do flogógeno. Até o final desse período, a atividade do fluido de edema é inaparente nas patas injetadas, embora tudo indique que deva crescer de zero até seu valor máximo com acumulação do exsudato. A partir da primeira hora, a velocidade de acúmulo de líquido passa a ser dose dependente (fig.21). No período compreendido entre uma e duas horas nada podemos afirmar quanto a atuação do princípio ativo nas patas com edema mas, a partir da segunda hora, quando a resposta já se manifesta notadamente nos membros contralaterais, certamente a redução observada na velocidade de acumulação do exsudato está diminuída, em relação ao período anterior, por força da captação linfática

acelerada. Aproximadamente na terceira hora, a remoção do fluido inflamatório iguala e supera a exsudação e, daí em diante, pelo menos até a sétima hora, período em estudo, essa última condição se mantém e se prolonga. A discussão aqui apresentada, obviamente independe da participação, isolada ou combinada, em sequência ou superposta de um ou mais mediadores, participantes causais ou casuais do edema experimental pela CRRG no rato, tão farta quanto inconvincentemente descritos.

O papel extremamente importante da microcirculação linfática na regulação do volume do líquido intersticial é hoje admitido sem contestação (Witte & Witte, 1973). O sistema linfático inicial não apenas subserve a todas as regiões do organismo, como representa a única via importante para prover recaptação de macromoléculas do interstício e sua recondução à circulação sanguínea (Casley-Smith, 1985). Quando o exsudato inflamatório, rico em proteínas, se coleta no interstício, os filamentos de ancoragem que interligam as superfícies externas das células endoteliais dos linfáticos "terminais" à fibras colágenas adjacentes e às outras estruturas conjuntivas, exercem tração sobre as paredes linfáticas dilatando esses delicados vasos, ampliando ou expondo as fenestrações intercelulares. Assim, em todos os tipos de inflamação, o exsudato é removido da área inflamada pela aceleração da função linfática normal (Hurley, 1978).

A diminuição de volume da pata posterior de ratos, por efeito da aplicação subplantar de CRRG contralateralmente, mostra que pelo menos um fator endógeno é ativado

provendo sistematicamente a maior eficiência ou velocidade de reabsorção do exsudato colecionado no interstício. A reprodução do fenômeno de redução do volume da pata de um rato normal, que foi injetado por via subplantar apenas com exsudato obtido de outro rato com edema pela CRRG, não se repete com SF, isto é, representa uma resposta à atividade contida realmente no fluido de edema.

CONCLUSÕES

## CONCLUSÕES

1. CRRG administrada na pata de ratos produz resposta edematogena significativamente maior do que quando duplicada simultaneamente em ambas as patas.

2. Em animais adrenalectomizados a resposta inflamatória à CRRG também é maior, mostrando a influência moduladora das adrenais sobre o edema.

3. A contra-irritação por administração simultânea de CRRG em ambas as patas, depende sô parcialmente da integridade funcional das adrenais, isto é, os níveis circulantes fisiológicos, basais de corticóides modulam as respostas edematogênicas localizadas, à CRRG.

4. A CRRG injetada por via subplantar produz retração do volume da pata contralateral.

5. Este fenômeno provavelmente decorre da aceleração da captação linfática.

SUMMARY

## SUMMARY

1. The phenomenon of counter-irritation has been experimentally analysed in Wistar rats under several conditions, subcutaneously injected with carrageenan suspensions in the sole face of hind-limb(s).

2. Work has been carried out trying to establish to what extent endocrine activation is essential to the full expression of the oedema inhibition by counter-irritation.

3. Effort has also been spent in assessing the importance of the previous "inflammatory status" of the animals, in relation to the oedema developed under standard experimental conditions.

4. It has been directly demonstrated the ability of the oedema fluid of reducing the volume of an untreated rat hind-limb. A hypothesis has been put forward to explain this activity.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, L. (1967). Lymphatics and lymphoid tissues. *Physiol. Rev.* 29:197-225.
- ALLISON, F.; Jr.; SMITH, M.R. & WOOD, W.B.; Jr. (1955). Studies in the pathogenesis of acute inflammation. I. The inflammatory reaction to thermal injury as observed in the rabbit ear chamber. *J. exp. Med.* 102:655-668.
- ANDERSON, W. & DUNCAN, J.G.C. (1965). The anticoagulant activity of carrageenin. *J. Pharm. Pharmacol.* 17(10):647-654.
- ATKINSON, R.M.; LESLEY JENKING; TOMICH, E.G. & WOOLLETT, E. A. (1962). The effects of some anti-inflammatory substances on carrageenin-induced granulomata. *Jour. Endocrinol.* 25(1):87-93.
- ATKINSON, D.C. (1971). A comparison of the systemic anti-inflammatory activity of the three different irritants in the rat. *Arch. int. Pharmacodyn.* 193:391-396.
- ATKINSON, D.C. & HICKS, R. (1975). The possible occurrence of endogenous anti-inflammatory substances in the blood of injured rats. *Brit. J. Pharmacol.* 53:85-91.
- BILLINGHAM, M.E.J.; ROBINSON, V.B. & ROBSON, J.B. (1969). Partial purification of anti-inflammatory factor(s) in inflam

- matory exudate. *Brit. J. Pharmacol.* 35:543-547.
- BONTA, I.L. & DE VOS, C.J. (1968). Report of work done at Organon Laboratories. Citado em Bonta, I.L. (1978).
- BONTA, I.L. & DE VOS, C.J. (1969). A natural anti-inflammatory response evoked by acute experimental inflammation. In: *Inflammation Biochemistry and Drug Interaction*. BERTELLI, A. & HOUCH, J.C. (eds.) Excerpta Medica, Amsterdam, pg. 118-121.
- BONTA, I.L. & NOORDHOEK, J. (1973). Anti-inflammatory mechanism of inflamed-tissue factor. *Agents and Actions* 3: 348-356.
- BONTA, I.L. (1978). Endogenous modulators of the inflammatory response. In: *Inflammation (Handbook of Experimental Pharmacology vol. 50/1)*. VANE, J.R. & FERREIRA, S. H. (eds.), Springer-Verlag, Berlin, pg. 523-560.
- BORIS, A. & STEVENSON, R.H. (1964). The assay of anti-inflammatory steroids by carrageenin induced exudate measurement. *Arch. Int. Pharmacodyn Therap.* 150(3/4):456-461.
- BRODIE, D.A. & HANSON, H.M. (1960). A study of the factors involved in the production of gastric ulcers by the restraint technique. *Gastroenterology* 38:353-360.
- BROWN, R.A. & WEST, G.B. (1965). Sympathomimetic amines and

- vascular permeability. *J. Pharm. Pharmacol.* 17:119-120.
- CALIGNANO, A.; CARNUCCIO, R.; Di ROSA, M.; IALENTI, A. & MONCADA, S. (1985). The anti-inflammatory effect of glucocorticoid-induced phospholipase inhibitory proteins. *Agents and Actions*. 16(1/2):60-62.
- CASLEY-SMITH, J.R. & FLOREY, H.W. (1961). The structure of normal small lymphatics. *Quart. J. exp. Physiol.* 46: 101-106.
- CASLEY-SMITH, J.R. (1985). Editorial: The importance of the lymphatic system. *Agents and Actions* 16(5):335.
- CYGIELMAN, S. & ROBSON, J.M. (1963). The effect of irritant substances on the deposition of granulation tissue in the cotton pellet test. *J. Pharm. Pharmacol.* 15:794-797.
- DAMAS, J. & REMACLE-VOLON, G. (1982). Kinins and edema induced by different carrageenans. *J. Pharmacol. (Paris)* . 13(2):225-240.
- DAVIES, G.E. (1963). Inhibition of guinea-pig complement "in vitro" and "in vivo" by carrageenin. *Immunology* 6: 561-568.
- DAVIES, G.E. (1965). Inhibition of complement by carrageenin: mode of action, effect on allergic reactions and on complement of various species. *Immunology* 8:291-299.

- DAVIDSON, L.R. (1980). *Handbook of Water - Soluble gums and resins*. McGraw-Hill Book Company, New York.
- Di PASQUALE, G. & GIRERD, R.J. (1961). Anti-inflammatory properties of lyophilized inflammatory exudate. *Am. J. Physiol.* 201:1155-1158.
- Di ROSA, M. & SORRENTINO, L. (1968). The mechanism of the inflammatory effect of carrageenin. *Eur. J. Pharmacol.* 4:340-342.
- Di ROSA, M. (1972). Biological properties of carrageenan. *J. Pharm. Pharmacol.* 24:89-102.
- Di ROSA, M.; GIROUD, J.P. & WILLOUGHBY, D.A. (1971). Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *J. Path.* 104:15-29.
- Di ROSA, M. & SORRENTINO, L. (1970). Some pharmacodynamic properties of carrageenin in the rat. *Brit. J. Pharmacol.* 38:214-220.
- GARCIA-LEME, J. & SCHAPOVAL, E.E.S. (1975). Stimulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis by compounds formed in inflamed tissue. *Brit. J. Pharmacol.* 53:75-83.
- GARCIA\_LEME, J. (1981). Regulation mechanisms in inflammatory: New aspects of autopharmacology. *Gen. Pharmac.* 12:15-24.

- GOLDSTEIN, S.; SHEMANO, I.; de MEO, R. & BEILER, J.M. (1967).  
Anti-inflammatory activity of several irritants in three  
models of experimental inflammation in rats. *Arch. int.  
Pharmacodyn.* 167:39-53.
- GREEN, K.L. (1972). The anti-inflammatory activity of cate-  
cholamines in the peritoneal cavity and hind paw of the  
mouse. *Brit. J. Pharmacol.* 45:322-332.
- GUISELEY, B.K.; STANLEY, F.N. & WHITEHOUSE, A.P. (1980).  
Carrageenan. In: *Handbook of Water - Soluble gums and  
resins*. DAVIDSON, L.R. (ed). Mac Graw Hill Book Compa -  
ny, New York pg 5. 1-5.29.
- HAWKINS, W.W. & LEONARD, V.G. (1962). Antipeptic and anti-  
thrombic properties of carrageenin. *Jour. Lab. and Clin.  
Med.* 60(4):641-648.
- HAWKINS, W.W. & LEONARD, V.G. (1963). The antithrombic ac-  
tivity of carrageenin in human blood. *Canadian J. Biochem.  
and Physiol.* 41(5):1325-1327.
- HICKS, R. (1969). The evaluation of inflammation induced  
by material implanted subcutaneously in the rat. *J. Pharm.  
Pharmacol.* 21:581-588.
- HORAKOVA, Z. & MURATOVA, J. (1965). Means of influencing  
the oedematous component of inflammation. In: *Non-ste-  
reoidal anti-inflammatory drugs*. GARATTINI, S. & DUKES ,

- M.N.G. (eds). Excerpta Medica Foundation. Amsterdam.  
pg. 237-244.
- HUMPREY, J.H. (1967). Cell-mediated immunity: General perspectives (a review of delayed hypersensitivity). *Brit. Med. Bull.* 23(1):93-97.
- HURLEY, J.V. & SPECTOR, W.G. (1965). A topographical study of increase vascular permeability in acute turpentine-induced pleurisy. *J. Path. Bact.* 89:245-254.
- HURLEY, J.V. & WILLOUGHBY, D.A. (1973). Acute inflammation a combined topographical and electron-microscope study of the mode of action of carrageenan. *Pathology* 5:9-21.
- HURLEY, J.V. (1978). The sequence of early events. In: *Inflammation (Handbook of Experimental Pharmacology. Vol. 50/1)*. VANE, J.R. & FERREIRA, S.H. (eds.). Springer Verlag, Berlin. pg. 523-560.
- HUNTER, J. (1794). A treatise on the blood, inflammation and gun-shot wounds. Cited in: *Encyclopaedia Britannica. Vol. II. p. 881. 1970.*
- IATRIDIS, P.G. & FERGUSON, J.H. (1965). Plasminogen generation test of normal, HF<sup>-</sup>, PTA<sup>-</sup>, X<sup>-</sup>, PTC<sup>-</sup> and AHF<sup>-</sup> platelet-poor plasmas: Evidence that only HF<sup>-</sup> plasma has an abnormal fibrinolytic activity. *Nature, (Lond.)* 207: 1404.

- IPSEN, J. & FEIGL, P. (1970). *Bancroft's Introduction of Biostatistics*. 2a. ed. Harper & Row, New York, pg. 42-54.
- JACKSON, D.S. (1957). Connective tissue growth stimulated by carrageenin. I. The formation and removal of collagen. *Biochem. J.* 65: 277-284.
- JORI, A. & BERNARDI, D. (1966). Presence of a general irritation and inhibition of a local inflammation. *Med. Pharmacol. exp.*, 14: 500-506.
- LADEN, C.; BLACKWELL, R.Q. & FOSDICK, L.S. (1958). Anti-inflammatory effects of counterirritants. *Am. J. Physiol.* 195: 712-718.
- LEAK, L.V. & BURKE, J.F. (1968). Ultrastructural studies on the lymphatic anchoring filaments. *J. Cell Biol.*, 36: 129-149.
- Mac CANDLESS, E.L. (1965). Lambda carrageenan as inducer of chronic inflammatory reactions in the guinea pig. *Ann. New York Acad. Sci.*, 118: 869-881.
- Mac CANDLESS, E.L. (1967). Sensitization reaction to carrageenan in the guinea pig. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 124: 1239-1242.
- MAJNO, G.; SHEA, S.M. & LEVENTHAL, M. (1969). Endothelial contraction induced by histamine type mediators. *J. Cell.*

*Biol.*, 42: 647-672.

NICOLL, A.P. & TAYLOR, E.A. (1967). Lymph formation and flow. *Ann. Rev. Physiol.*, 39: 73-95.

NOORDHOEK, J. & BONTA, J.L. (1972). The mechanism of the anti-inflammatory and hipotensive effect of carrageenin. *Arch. int. Pharmacodyn.* 297: 385-386.

NOORDHOEK, J. & BONTA, J.L. (1974). Mechanism of the anti-inflammatory effect of carrageenin pouch exudate. In: *Future trends in inflammation*. VELO, G.P.; WILLOUGHBY, D. A. & GIROUD, J.P. (eds). Piccin Med. Books Publ., Padua London, pg. 249-259.

O'NEILL, A.N. (1955). 3,6-anhydro-D-galactose as a constituent of K-carrageenin. *J. Amer. Chem. Soc.*, 77(10): 2837-2839.

RINDANI, T.H. (1956). Recovery of an anti-inflammatory fraction from inflammatory exudate. *Indian J. Med. Res.*, 44: 673-675.

ROBERTSON, W. van B. & SCHWARTZ, B. (1953). Ascorbic acid and the formation of collagen. *J. Biol. Chem.*, 201: 689-696.

ROBINSON, B.V. & ROBSON, J.M. (1964). Production of an anti-inflammatory substance at a site of inflammation.

- Brit. J. Pharmacol.*, 23: 420-432.
- ROCHA e SILVA, M.; CAVALCANTI, R.Q. & REIS, M. L. (1969).  
Anti-inflammatory action of sulfated polysaccharides.  
*Biochem. Pharmacol.*, 18: 1285-1295.
- ROTHSCHILD, A.M. & GASCON, L.A. (1966). Sulphuric esters  
of polysaccharides as activators of a bradykinin- forming  
system in plasma. *Nature (Lond)*, 212: 1364.
- SCHACHTER, M. (1956). A delayed slow contracting effect of  
serum and plasma due to the release of a substance resem-  
bling kallidin and bradykinin. *Brit. J. Pharmacol.* 11:  
111-118.
- SCHWARTZ, H.J. & KELLERMEYER, R.W. (1969). Carrageenan and  
delayed hipersensitivity. II. Activation of Hageman fac-  
tor by carrageenan and its possible significance. *Proc.  
Soc. Biol. Med.*, 132: 1021-1024.
- SELYE, H.; CONNINGTON, J.; SOMOGYI, A. & COTE, G. (1969).  
Acceleration and inhibition of wound healing by topical  
treatment with different types of inflammatory irritants.  
*Am. J. Surg.*, 117: 610-614.
- SLACK, H.G.B. (1957). Connective tissue growth stimulated  
by carrageenin. 2. The metabolism of sulphated polysac-  
charides. *Biochem. J.*, 65: 459-464.

- SMITH, D.B.; COOK, W.H. & NEAL, J.L. (1954). Physical studies on carrageenin and carrageenin fractions. *Arch. Biochem. and Biophys.* 53(1): 192-204.
- SMITH, D.B.; O'NEILL, A.N. & PERLIN, A.S. (1955). Studies on the heterogeneity of carrageenin. *Canadian Jour. Chem.* 33(8): 1352-1360.
- SPECTOR, W.G. & WILLOUGHBY, D.A. (1963). The inflammatory response. *Bacteriol. Review*, 27: 117-154.
- THOMSON, A.W. & FOWLER, E.F. (1981). Carrageenan: A review of its effects on the immune system. *Agent and Actions* 11(3): 265-273.
- TSENG, C.K. (1945). The terminology of seaweed colloids. *Science, N.Y.* 101(2633):597-602.
- UNGAR, G. (1966). La douleur et l'inflammation: leur mécanismes biochimiques. In: *La Biologie de l'inflammation*. PARROT, J.L. (ed.). Masson et Cie, Paris, pg. 147.
- UNGAR, G. (1969). Role of humoral and cellular protease systems in inflammation. In: *Inflammation Biochemistry and Drug Interaction*. BERTELLI, A. & HOUCK, J.C. (eds). Excerpta Medica Foundation, Amsterdam, pg. 3-11.
- VINEGAR, R.; TRUAX, J.F.; SELPH, J.L. & JOHNSTON, P. R. (1979). Antagonism of pain and hyperalgesia. In: *Anti-*

- inflammatory Drugs* (Handbook of Experimental Pharmacology, vol. 50/II). VANE, J.R. & FERREIRA, S.H. (eds.) Springer Verlag, Berlin, pg. 75-88.
- WINDER, C.V.; WAX, J.; BEEN, M.A. (1975). Rapid foot volume measurements of unanesthetized rats and the question of a phenylbutazone effect on anaphylactoid edema. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 112: 174.
- WILLOUGHBY, D.A.; COOTE, E. & TURK, J.L. (1969). Complement in acute inflammation. *J. Pathol.*, 97: 295-307.
- WINTER, C.A.; RISLEY, E.A. & NUSS, G.W. (1962). Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 111: 544-547.
- WINTERNITZ, R. (1901). "Über die entzündungswidrige Wirkung "ätherischer Öle. Naunyn-Schmiedeberg's. *Arch. exp. Path. Pharmak.* 46: 163-180.
- WITTE, M.H. & WITTE, C.L. (1973). Physiology 301 (Clinical Correlation (Lectures). Lymph formation > lymph absorption. The formula of edema. A second experiment in the teaching of lymphology to medical students. *Lymphology* 6: 101-109.