

UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP  
PROGRAMA DE MESTRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

EFEITO ANTIINFLAMATÓRIO DA FRAÇÃO APOLAR  
DO EXTRATO DAS FÔLHAS DE *NEPETA CATARIA*  
(*catnip*) EM RATAS

Relatório de Qualificação apresentado  
ao Programa de mestrado em Medicina  
Veterinária da Universidade Paulista –  
UNIP, como requisito parcial para  
obtenção de título de mestre em  
Medicina Veterinária, sob orientação da  
Profa. Dra. Maria Martha Bernardi.

Luiz Renato Flaquer Rocha

São Paulo

2007

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Rocha, L.R.F.

**EFEITO ANTIINFLAMATÓRIO DA FRAÇÃO APOLAR DO EXTRATO DAS FÔLHAS DE *NEPETA CATARIA* (*catnip*) EM RATAS** / Luiz Renato Flaquer Rocha - São Paulo – L.R.F. Rocha, 2007.  
109 f.

Dissertação (mestrado) - UNIVERSIDADE PAULISTA, Faculdade de Medicina Veterinária. São Paulo, 2007.

Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária  
Área de concentração: Imunopatologia Veterinária

Versão do título em inglês: **THE ANTI - INFLAMMATORY EFFECTS FROM THE APOLAR EXTRACT OF THE *NEPETA CATARIA* LEAVES IN RATS.**

Orientador: Profa. Dra. Maria Martha Bernardi.

1. *nepeta cataria* 2. inflamação 3. edema de pata 4. citometria de fluxo

UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA  
VETERINÁRIA

A comissão examinadora, abaixo assinada aprova a dissertação:

EFEITO ANTIINFLAMATÓRIO DA FRAÇÃO APOLAR  
DO EXTRATO DAS FÔLHAS DE *NEPETA CATARIA* (*catnip*)  
EM RATAS

Elaborada por Luiz Renato Flaquer Rocha  
Como requisito para obtenção do Título de Mestre em Medicina  
Veterinária

Comissão examinadora

-----  
Profa. Dra. Maria Martha Bernardi

-----  
Profa. Dra. Cristina de Oliveira Massoco Salles Gomes.

-----  
Profa. Dra. Leoni Vilano Bonamin

São Paulo, 14 de março de 2007

## **Agradecimentos especiais**

A minha mãe que sempre me apoiou e nunca me fez desistir dos meus objetivos, sendo um exemplo de pessoa lutadora e que eu admiro e amo muito.

Ao meu pai (*in memoriam*), que pode me proporcionar meus estudos e que me ensinou a ser um Homen.

Aos meus irmãos Carlos e Luiz Carlos, os quais amo muito, e que estão ao meu lado em todos os momentos da minha vida.

A minha esposa e aos meus filhos, Gabrielle e Lucas, que tanto amo, agradeço pela paciência e compreensão que tiveram nos momentos de minha ausência.

Ao meu cunhado Marcelo, quem tanto estimo e admiro e que me ajudou nos cálculos estatísticos.

A Dra. Cristina Massoco, a qual é uma pessoa que me orgulho de te-la como colega de turma e que tenho muita admiração e respeito. É para mim, um exemplo de pesquisadora. Obrigado minha grande amiga.

MEUS AGRADECIMENTOS A TODOS QUE TIVERAM ALGUMA  
PARTICIPAÇÃO NA REALIZAÇÃO DESTE TRABALHO

A Dra. Luciana Vismari pela dedicação, orientação, atenção, e paciência; ao Dr. Ricardo Lazzarini pelo apoio, colaboração e incentivo a pesquisa e nos experimentos.

Ao Prof.Dr.João Palermo-Neto, pela concessão do uso dos laboratórios, e do aparelho de citometria e plestimografia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Ao Dr. Emerson do laboratório de patologia, “Histopet®”, e a Profa. Dra. Leoni Vilano Bonamin, que me ajudaram com as leitura e fotomicrografia das lâminas de histologia.

Ao técnico de histopatologia , Paulo Ailton Vedovato do laboratório de patologia da Universidade Paulista – UNIP que realizou a confecção das lâminas para histologia.

Ao Prof.Dr. Nicolau *in memorian* , o qual me incentivou muito, e foi o responsável pelo meu início ao curso de mestrado.

Por fim a Deus que me proporcionou, me guiou, e colocou todas essas pessoas no meu caminho. Obrigado a todos.

### ***Dedicatória especial***

*Muitos de nós encontramos em nossas vidas pessoas que são como anjos, pessoas muito especiais, essa pessoa em questão é a minha orientadora, amiga: Professora Dra. Maria Martha Bernardi.*

*Obrigado por tudo, pelos ensinamentos, pela dedicação, confiança, acreditando em mim para ser um dos seus orientados, compartilhando todos os seus conhecimentos e dedicação à pesquisa, fazendo com que eu realize um sonho, um objetivo que estou podendo concretizar.*

*Saiba que lhe admiro e lhe respeito muito,*

*Obrigado meu anjo.*

“Sonhos são para sonhadores”,

“Objetivos são para vencedores”,

Hoje sou um vencedor sonhador, pois além ter sonhado por esse dia, busquei o meu objetivo, e por isso, devo o meu muito obrigado a todos e a Deus por ter me proporcionado tudo isto.

## RESUMO

### EFEITO ANTIINFLAMATÓRIO DA FRAÇÃO APOLAR DO EXTRATO DAS FOLHAS DE *NEPETA CATARIA* (CATNIP) EM RATAS

Este trabalho investigou o efeito antiinflamatório da fração apolar do extrato das folhas de *N. cataria*. Para tanto se utilizou ratas Wistar e foi avaliado o edema de pata induzidas pela carragenina lambda 1% e, por meio da técnica de citometria de fluxo, a geração do *burst* oxidativo e a capacidade fagocítica das células do sangue periférico em animais tratados ou não com o extrato. Os resultados mostraram que: 1) as doses de 25, 50 e 100 mg/kg do extrato de *N.cataria* reduziram significativamente o edema de pata das ratas de forma dose e tempo dependentes 2) na citometria mostrou-se que a dose de 1 µg do extrato *in vitro* promoveu redução na geração de *burst* oxidativo, na porcentagem e na intensidade de fagocitose. Sugeriu-se que o extrato apolar de *N.cataria* apresenta efeito antiinflamatório parcial por interferir com mecanismos iniciais do processo inflamatório agudo.; 3) à análise da histologia do coxim plantar de animais com edema de pata induzido pela carragenina e tratados com a dose de 100 mg/kg do extrato da planta observou-se severo infiltrado de células polimorfonucleares, discreto infiltrado de mononucleares, moderada distensão/ dissociação do tecido conjuntivo, e marginação leucocitária, bem como dilatação de vasos linfáticos

**Palavras chaves:** *Nepeta cataria*, inflamação, edema de pata, citometria.

## ABSTRACT

### THE ANTI - INFLAMMATORY EFFECTS FROM THE APOLAR EXTRACT OF THE *NEPETA CATARIA* LEAVES IN RATS.

This work investigated the anti-inflammatory effects of *Nepeta cataria* leaves apolar extract in rats. Thus, the extract effects on carrageenan-induced inflammatory paw edema, on oxidative burst generation, on phagocytosis percentage and intensity as well on the histology of paw edema were examined. Results showed that::

1) 25, 50 and 100 mg/kg doses reduced the carrageenan-induced inflammatory paw edema in a dose dependent way; 2) the extract 1 µg/Kg dose reduced the oxidative *burst* generation as well as the phagocytosis percentage and intensity. It was suggested that the apolar extract of *Nepeta cataria* have anti-inflammatory effects probably by an interference with earlier mechanisms involved in the inflammatory process; 3) In the histology we had a severe one infiltrated of polimorfonucleares cells, discrete infiltrated of mononuclear cells, moderate dilatation / dissociation of the conjunctive tissue, and the leukocytes margination, as well as in the dilation of lymphatic vases; were observed in paws edema of animals the carrageenan-induced and treated with the apolar extract with 100 mg/kg dose.

**Key words:** *Nepeta cataria*, inflammation, paw edema, cytometric studies

## Lista de Abreviações

AA	-Ácido aracdônico
ADP	-Difosfato de adenosina
COX	-Ciclooxigenase
C3	-Sistema complemento C3
C5	-Sistema complemento C5
CR3	-Complemento R3
DCFH-DA	-Reagente 2'7'diacetato de diclorofluoresceína
EDTA	-Etilenodiamina-tetra-ácetico
ERO	-Espécie reativa de oxigênio
ERN	-Espécie reativa de nitrogênio
FITC	-Isoticianato fluorescentes
FAP	-Fração apolar
FSC	-Forward side scatter (Feixe óptico de luz que indica o tamanho da célula)
SSC	-Side scatter (Feixe óptico de luz que indica a granulidade da célula)
GC	-Grupo controle
GE1	-Grupo experimental - dose de <i>nepeta cataria</i> 25mg/kg
GE2	-Grupo experimental - dose de <i>nepeta cataria</i> 50mg/kg
GE3	-Grupo experimental - dose de <i>nepeta cataria</i> 100mg/kg
GE4	-Grupo experimental - dose de dexametasona 1mg/kg
GM-CSF	-Fator estimulador de colônia (granlócito/macrófago)
H <sup>1</sup>	-Receptores farmacológicos histamínico do tipo H <sup>1</sup>
H <sup>2</sup>	-Receptores farmacológicos histamínico do tipo H <sup>2</sup>
H <sup>3</sup>	-Receptores farmacológicos histamínico do tipo H <sup>3</sup>
HE	-coloração hematoxicilina e eosina

5-HT	-5-hidroxitriptamina
ICAM-1	-Molécula de adesão intracelular 1
IL	-Interleucina
IL-1	-Interleucina 1
IP	-Intraperitoneal
Kg	-Kilograma
Lb	-Leitura basal
LFA-1	-Antígeno associado a função de linfócito 1
L-NAME	-L-N-nitro arginine methyl ester
LT	-Leucotrieno
mg	-Miligrama
nM	-Nano molar
µg	-Micrograma
µM	-Micro molar
ml	-Mililitro
<i>N.Cataria</i>	- <i>Nepeta cataria</i>
NADPH-oxidase	-Enzima ligada a produção de espécie reativas de oxigênio
NO	-Óxido nítrico
NOS	-Enzima óxido nítrico sintetase
ONCO-BCG	-Cepa atenuada do bacilo Camette-Guerin
PAF	-Fator de agregação plaquetária
PBS	-Solução Salina Tamponada
PMA	-Miristato-acetato de forbol
PI	-Iodeto de propídeo
PG	-Prostaglandinas
PGE2	-Prostaglandina 2

PMN	-Células polimorfonucleares
PV	-Permeabilidade vascular
q.s.p.	-Quantidade suficiente para
SAPI	- <i>Staphylococcus aureus</i> conjugada com iodeto de propídeo
SNC	-Sistema nervoso Central
TNFa	-Fator de necrose tumoral alfa

## Lista de figuras

### Figuras:

- Figura 1** - Quadro da representação esquemática da mediação química da resposta inflamatória. **27**
- Figura 2** - Quadro da representação esquemática dos componentes e do funcionamento do citômetro de fluxo. Os detectores (FMT) captam a luz do laser, e a lançam sobre os detectores posicionados horizontalmente (FSC) e perpendicularmente (SSC) em relação ao laser, podendo medir mais 3 canais de fluorescência nas diferentes cores: verde, amarelo e vermelho. **32**
- Figura 3** - Imagem do coxim plantar de rata; local de aplicação da carragenina lambda 1 %. **49**
- Figura 4** - Imagem do aparelho que faz a leitura do volume da pata Imagem do aparelho de plestimografia (Plethysmometer-Ugo Basile®, Itália), que faz a leitura do volume da pata. **51**
- Figura 5** - Imagem do início da introdução da pata para fazer a medida volumétrica da pata, e a marca feita na articulação tarsiana para termos como base para realização das medidas **51**
- Figura 6**- Imagem da pata da rata, com marcação do tarso para medida, no plestimógrafo no tempo Lb (basal) e no tempo 4 (4 horas após aplicação da carragenina 1%) **52**
- Figura 7** - Imagem das patas retiradas para realização da fixação no formol para realização da histologia **58**

- Figura 8** - Quadro esquemático do protocolo experimental de edema de pata 58
- Figura 9** - Efeito da administração de *N. cataria* no edema de pata de ratas induzido pela carragenina. São apresentadas as diferenças de volume entre os valores basais e da medida no momento de cada grupo. As doses do extrato apolar de *N. cataria* foram 25mg/kg , 50mg/kg, 100mg/kg, i.p.; da dexametasona 1mg/kg e os animais do grupo controle receberam uma suspensão de PBS em Tween 80 61
- Figura 10** - Efeito da administração de *N. cataria* no edema de pata de ratas induzido pela carragenina. São apresentadas as diferenças de volume entre os valores basais e da medida no momento de cada grupo. A dose do extrato apolar de *N. cataria* de 100mg/kg, i.p.; e da dexametasona 1mg/kg e os animais do grupo controle receberam uma suspensão de PBS em Tween 80. 62
- Figura 11** - Quadro da representação esquemática da seqüência de reagentes utilizados na técnica de burst e fagocitose 64
- Figura 12** - Demonstração gráfica dos resultados do 1º experimento replicado comparando as duas doses de 1µg e 10ng/kg comparados ao controle. 67
- Figura 13** - Demonstração gráfica dos resultados do 2º experimento comparando as duas doses de 1µg e 10 ng/kg comparados ao controle. 70
- Figura 14** - Quadro de resultados da análise qualitativa obtidas nos grupos (G C, G. 2, G 3), para os diferentes parâmetros e seus respectivos escores 74

## Lista de tabelas

**Tabela 1** - Efeitos da administração de *N. cataria* no edema de pata de ratas induzido pela carragenina. As doses do extrato apolar de *Nepeta cataria* foram 25mg/kg (grupo G1), 50mg/kg (grupo G2), 100mg/kg (grupo G3) e da dexametasona 1mg/kg (grupo G4) **59**

**Tabela 2** - Efeito da administração de *Nepeta cataria* no edema de pata de ratas induzido pela carragenina. São apresentadas as diferenças de volume entre os valores basais e da medida no momento de cada grupo. As doses do extrato apolar de *N. cataria* foram 25mg/kg , 50mg/kg, 100mg/kg, i.p.; da dexametasona 1mg/kg e os animais do grupo controle receberam uma suspensão de PBS em Tween 80 **60**

**Tabela 3** - Efeito das doses de 1 µg/kg e 10 ng/kg do extrato da *N. cataria* sobre as células peritoneais de ratas sobre geração de *burst* oxidativo, e da capacidade de fagocitose, avaliando a porcentagem, e intensidade de fagocitose, *burst* basal e *burst* induzido comparado com o controle. **66**

**Tabela 4** - Efeito das doses de 1 µg/kg e 10 ng/kg do extrato da *nepeta cataria* sobre as células peritoneais de ratas sobre geração de *burst* oxidativo, e da capacidade de fagocitose, avaliando a porcentagem, e intensidade de fagocitose, *burst* basal e *burst* induzido comparado com o controle. **69**

## **Lista de Ilustrações**

### **1. Fotos:**

**Foto 1** - Foto ilustrativa da planta da *N. cataria* **42**

**Foto 2** - Foto da *N. cataria* na natureza **42**

**Foto 3** - Citômetro de fluxo (*Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA*), conectado com um computador (*Macintosh Apple, CA, USA*). Utilizando-se o software Cell Quest (*Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA...*) **49**

### **2 . Fotomicrografias :**

**Fotomicrografia 1** - Corte histológico do tecido celular subcutâneo do coxim plantar posterior esquerdo de ratas, do grupo controle, coloração Hematoxilina e eosina (HE), visualizadas no aumento de 100x e 400x . **75**

**Fotomicrografia 2** - Corte histológico do tecido celular subcutâneo do coxim plantar posterior esquerdo de ratas, coloração Hematoxilina e eosina (HE), visualizadas no aumento de 100x e 400x. G2 - dose de 100mg do extrato apolar de *N.cataria*. **75**

**Fotomicrografia 3** - Corte histológico do tecido celular subcutâneo do coxim plantar posterior esquerdo de ratas, coloração Hematoxilina e eosina (HE), visualizadas no aumento de 100x e 400x. G3 - dose de 1mg de dexametasona. **75**

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>18</b>
<b>2. OBJETIVO</b>	<b>40</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>41</b>
3.1 Animais	41
3.2 Planta	42
3.3 Extração e isolamento do extrato	43
3.4 Fármacos e Reagentes	43
3.5 Preparação do extrato de <i>Nepeta cataria</i> e da dexametasona.	45
3.6 Procedimentos Experimentais	46
<b>4. ANÁLISE ESTATÍSTICA</b>	<b>53</b>
<b>5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS</b>	<b>54</b>
5.1 Efeito antiinflamatório da fração apolar do extrato das folhas de <i>N. cataria</i> sobre o edema de pata	54
5.2 Validação da dose da fração apolar (FAP) do extrato das folhas de <i>N. cataria</i> com efeito antiinflamatório por meio da avaliação da geração de <i>burts</i> oxidativo de capacidade de fagocitose de neutrófilos sanguíneos.	63
5.3 Comparação do efeito antiinflamatório da dose de 100mg/kg da fração apolar do extrato das folhas de <i>Nepeta cataria</i> com 1mg/kg de dexametasona em edema de pata induzido por carragenina 1% por meio de estudos histológicos na fase aguda de 4 horas (fase de maior inflamação), comparando com o grupo controle.	71
<b>6. DISCUSSÃO</b>	<b>76</b>
<b>7. CONCLUSÃO</b>	<b>87</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>89</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Sobre o processo inflamatório:

A inflamação é uma resposta do organismo a uma injúria química, física ou biológica que leva á alterações vasculares e celulares como: alterações locais de fluxo sanguíneo, de permeabilidade vascular, infiltrado de leucócitos no local e liberação de mediadores químicos que produzem rubor, tumor, calor, dor e perda função. (FLOREY, 1970; GALLIN *et al.*, 1992; MAJNO & JORIS, 1996; CONTRAN *et al.*, 1999; MELLO & LAURINDO, 2000). Esses fenômenos decorrem, em grande parte, da ação de mediadores de origem plasmática e/ou celular, os quais podem estar formados ou armazenados em grânulos ou serem recém-sintetizados, que são liberados no decorrer da resposta inflamatória (GARCIA LEME, 1989; BUCKLEY & BRAIN, 1994).

Com freqüência, esses fenômenos levam a uma resolução do processo com restauração da função; entretanto em algumas condições o processo pode progredir para cronicidade, promovendo alterações e destruição dos tecidos subjacentes, acrescentando, aos quatro sinais clássicos, o quinto e mais danoso: a perda de função. (MELLO & LAURINDO, 2000)

Os fenômenos vasculares da inflamação ocorrem na rede micro circulatória e se iniciam com breve vasoconstricção arteriolar, seguida de vasodilatação arteriolar e venular, abertura da rede capilar e aumento do fluxo sanguíneo local, acompanhado de aumento da permeabilidade vascular (PV), particularmente de vênulas pós-

capilares, com conseqüente extravasamento do fluido e material protéico do plasma para o interstício, formando-se, assim, o edema (GARCIA LEME *et al.* 1973). O edema é, pois, um dos pontos cardeais do processo inflamatório agudo (GALLIN *et al.*, 1992).

O processo inflamatório pode ser diferenciado a partir da natureza do agente lesivo, do tipo celular predominante, a predominância de um ou outro mediador químico. Certas reações alérgicas, que se desenvolvem em poucos minutos após o reconhecimento do antígeno por uma imunoglobulina E, envolvem células específicas, como mastócitos e eosinófilos e têm a mediação química predominantemente histamínica. Por outro lado, reações iniciadas por traumas teciduais ou por imunocomplexos abrangem principalmente neutrófilos e macrófagos e a mediação química tem uma grande participação da ativação do sistema do complemento. (MELLO & LAURINDO, 2000)

### **1.2.Eventos celulares da resposta inflamatória e sua mediação química:**

A histamina está entre as primeiras substâncias a serem liberadas na inflamação aguda (MELLO & LAURINDO, 2000). Sabe-se que os efeitos farmacológicos causados por esta substância são conseqüentes à sua ligação com pelo menos três receptores farmacológicos distribuídos amplamente no organismo (HILL *et al.*, 1997). Tais receptores são denominados de H<sup>1</sup> (ASH & SCHILD, 1996), H<sup>2</sup> (BLACK *et al.*, 1972) e H<sup>3</sup> (ARRANG *et al.*, 1983)

Nas células endoteliais vasculares a ativação dos receptores H<sup>1</sup> desencadeia aumento de permeabilidade vascular (particularmente nas vênulas pós-capilares) (MILLER & SIMS, 1986), síntese de prostaciclina (JOHNSON *et al.*, 1985), síntese de fator de agregação plaquetária (PAF) (MCINTYRE *et al.*, 1985) e liberação de óxido nítrico (NO) (IGNARRO, 1990)

Os receptores H<sup>2</sup> estimulam a secreção de ácido pelas células parietais do estômago e têm uma série de efeitos imunomodulatórios: como inibição da liberação do conteúdo dos lisossomos dos neutrófilos e basófilos, inibição da produção de linfocinas pelos linfócitos e aumento da atividade supressora de linfócito T (MELMON *et al.*, 1981).

Nos basófilos e mastócitos, os receptores H<sup>2</sup> também regulam negativamente a liberação de histamina (LICHTENSTEIN & GILLESPIE, 1975). Com relação aos receptores H<sup>3</sup> alguns autores admitem que sejam capazes de inibir a liberação de autofarmacos na reação anafilática (KOHNO *et al.*, 1994), acreditando-se que a ativação desses receptores cause importante efeito sobre os eosinófilos humanos (RAIBLE *et al.*, 1992).

A histamina é liberada em resposta a vários estímulos, dentre eles frações de complemento, neuropeptídeos e citocinas, induzindo a moderada vasodilatação e incremento na permeabilidade microvascular. (MELLO & LAURINDO, 2000), isso decorre devido aos principais mediadores inflamatórios do sistema complemento são as proteínas C3 e C5.

O sistema complemento, C5, ativa a via da lipooxigenase do metabolismo do ácido araquidônico (AA) nos neutrófilos e monócitos, provocando, posteriormente, a liberação de mediadores inflamatórios.

O C5a incrementa adesão, quimiotaxia para mastócitos, polimorfonucleares e basófilos, além da ativação leucocitária; o C3a e C3b, quando fixados á parede celular de bactérias atuam como opsoninas. (MELLO & LAURINDO, 2000)

No processo inflamatório, a prostaglandina 2 (PGE<sub>2</sub>) é um potente dilatador de músculo liso vascular resultando vasodilatação e eritema. A vasodilatação aumenta o fluxo sanguíneo no tecido inflamado e agente como a bradicinina e histamina, que aumentam a permeabilidade vascular, ocasionam extravasamento de fluido. Ou seja, PGE<sub>2</sub> age em sinergismo com outros mediadores para produzir edema, dor, etc. não produzindo dor diretamente, a qual é mediada pela produção de óxido nítrico (NO) e de prostaglandinas (PG), pelas células endoteliais vasculares. (WILLIAMS, K. L.; HIGGS, G. A., 1988; WILLIAMS, T. J.; MORLEY, J., 1973; WILLOUGHBY, D. A., 1968; MONCADA, S. & VANE, 1979).

Neste sentido, as prostaglandinas e os leucotrienes (LT), também chamados de eicosanóides, são derivados do metabolismo do ácido araquidônico e, liberados, agem ou atuam em uma variedade de processos biológicos, incluindo a inflamação. Podem mediar diferentes passos da inflamação: (PGE<sub>2</sub>) e prostaciclina são importantes na vasodilatação inflamatória, e potenciam o aumento da permeabilidade vascular e da quimiotaxia promovidas por outros mediadores. (MELLO & LAURINDO, 2000)

A serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT) tem ações semelhantes à histamina e está presente nas plaquetas e células enterocromafins, sendo vaso ativa com grande participação no processo inflamatório (GARCIA LEME *et al.*, 1973; KANETA *et al.*, 1984; QU *et al.*, 1991 e ELWOOD *et al.*, 1994). Seus receptores farmacológicos estão largamente distribuídos no organismo e são subdivididos em pelo menos três classes principais: 5-HT<sup>1</sup>, 5-HT<sup>2</sup>, e 5-HT<sup>3</sup> (BRADLEY *et al.*, 1986). A ativação destes receptores é capaz de relaxar ou estimular a musculatura lisa, de influenciar a liberação de noradrenalina pelos nervos adrenérgicos e de estimular a produção de NO pelas células endoteliais (BRADLEY *et al.*, 1986; PEACH *et al.*, 1985). A sua liberação acontece quando agregados plaquetários entram em contato com colágeno, trombina, difosfato de adenosina (ADP) e complexos antígenos-anticorpo.

### **1.3.Sobre os macrófagos**

O macrófago foi descrito por METCHNIKOFF em 1905 que o referiu como uma célula com capacidade fagocitária. Foi, entretanto, somente a partir dos estudos de MACKANESS *et al.* (1970), que se reconheceu a importância da atividade secretora destas células. Inicialmente classificado como pertencente ao sistema reticulo-endotelial (ASCHOFF, 1924). O macrófago foi posteriormente, incorporado ao sistema mononuclear fagocitário (VAN FURTH *et al.*, 1972).

Neste contexto, como membros do sistema mononucleares fagocíticos, os macrófagos são derivados da medula óssea, circulam

no sangue como monócitos e diferenciam-se em macrófagos nos tecidos, sendo denominados de células de Kupffer no fígado, macrófagos alveolares no pulmão, macrófagos peritoneais no peritônio, células da microglia no Sistema nervoso Central (SNC) e osteoclastos no Sistema ósseo (AUGER *et al*, 1991; ABBAS, 2003).

Nestes tecidos e cavidades, os macrófagos algumas vezes, ficam relativamente quiescentes como células residentes, com pequena atividade funcional. A baixa capacidade de espraiamento, fagocitose e de secreção basal de determinados produtos tais como lisosimas, proteinases neutras e ácidas e espécies reativas de oxigênio, confere a esta célula fraca capacidade microbicida e fungicida (COHN, 1978; TAKEMURA e WERB, 1984).

Estas células mantêm-se relativamente dormentes nos tecidos até que sinais indutivos apropriados levem a sua ativação (COSTA ROSA *et al*, 1995). Neste sentido, quando os macrófagos residentes encontram corpos estranhos, eles expõem diversas integrinas presentes na membrana celular, que participam do processo de sua ativação; dentre estas, destacam-se os receptores CR3, LFA-1 e ICAM-1 que reconhecem outras moléculas e componentes de matrizes extracelulares, aumentando a capacidade de espraiamento e fagocitose destas células.

Nesta situação, os macrófagos passam a ser denominados de ativados (ADAMS e HAMILTON, 1984). Esta ativação envolve diferentes estágios (COHN, 1978; GORDON, 1986; WERB *et al.*, 1986; NATHAN, 1987) que permitem caracterizar estas células como:

a) *Macrófagos inflamatórios* são estimulados por fatores inflamatórios específicos e possuem elevada atividade secretora como, por

exemplo, proteinases neutras bem como de espraiamento e fagocitose e baixa atividade tumoricida ou microbicida. Estas células podem ser obtidas experimentalmente, através da administração de diversas substâncias, tais como tioglicolato, carragenina, gotas de biogel de poliacrilamina e lipopolissacarídeos de membrana de bactéria (HOPPER, 1986; VAN ROOIJEN e SANDRES, 1997). Entretanto, deve-se ressaltar que os macrófagos obtidos a partir do uso de diferentes agentes têm algumas diferenças nos padrões de substâncias que secretam (WERB; BAND; JONES, 1980; WERB; CHIN, 1981).

*b) Macrófagos ativados* são estimulados por fatores imunológicos, via produtos derivados de linfócitos; apresentam baixa atividade secretora de proteinases neutras, porém possuem alta atividade em secretar metabólitos reativos de oxigênio como ânion superóxido e peróxido de hidrogênio. Estas células têm relevante atividade tumoricida e microbicida (COHN, 1978; KARNOVSKY; LAZDINS, 1978; NORTH, 1978; ADAMS e HAMILTON, 1984; JORENS *et al.*, 1995).

Experimentalmente, pode-se induzir ativação de macrófagos, infectando-se os animais com microorganismos como, por exemplo, com as micobactérias (bacilo Calmet Guerin-BCG), com *Trypanosoma cruzi* ou, ainda, com o uso de citocinas, produzidas por linfócitos T ativados (TAKEMURA e WERB, 1984).

Os macrófagos ativados secretam substâncias importantes para a resposta imunológica, dentre as quais os componentes de sistema complemento, as citocinas (em especial, IL-1 e o TNF- $\alpha$ ) e as espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN) (COHN, 1968 e 1978).

O TNFa é o principal mediador da resposta inflamatória aguda por bactérias gram-negativas e outros microorganismos infecciosos e é responsável por muitas das complicações sistêmicas das infecções graves. A principal função fisiológica do TNF é estimular o recrutamento de neutrófilos e de monócitos para os sítios de infecção para ativar essas células para erradicarem microorganismos. As ações do TNF sobre o endotélio e os leucócitos são essenciais para a resposta inflamatórias locais aos microrganismos, atua também sobre os fagócitos mononucleares para estimularem a secreção da IL-1, que atua de modo semelhante ao TNF (ABBAS, 2003).

A IL-1 a sua principal função, de modo semelhante ao TNF, é servir como mediador da resposta inflamatória do hospedeiro às infecções e a outros estímulos inflamatórios. A IL-1 funciona em conjunto com o TNF na imunidade inata e na inflamação. (ABBAS, 2003)

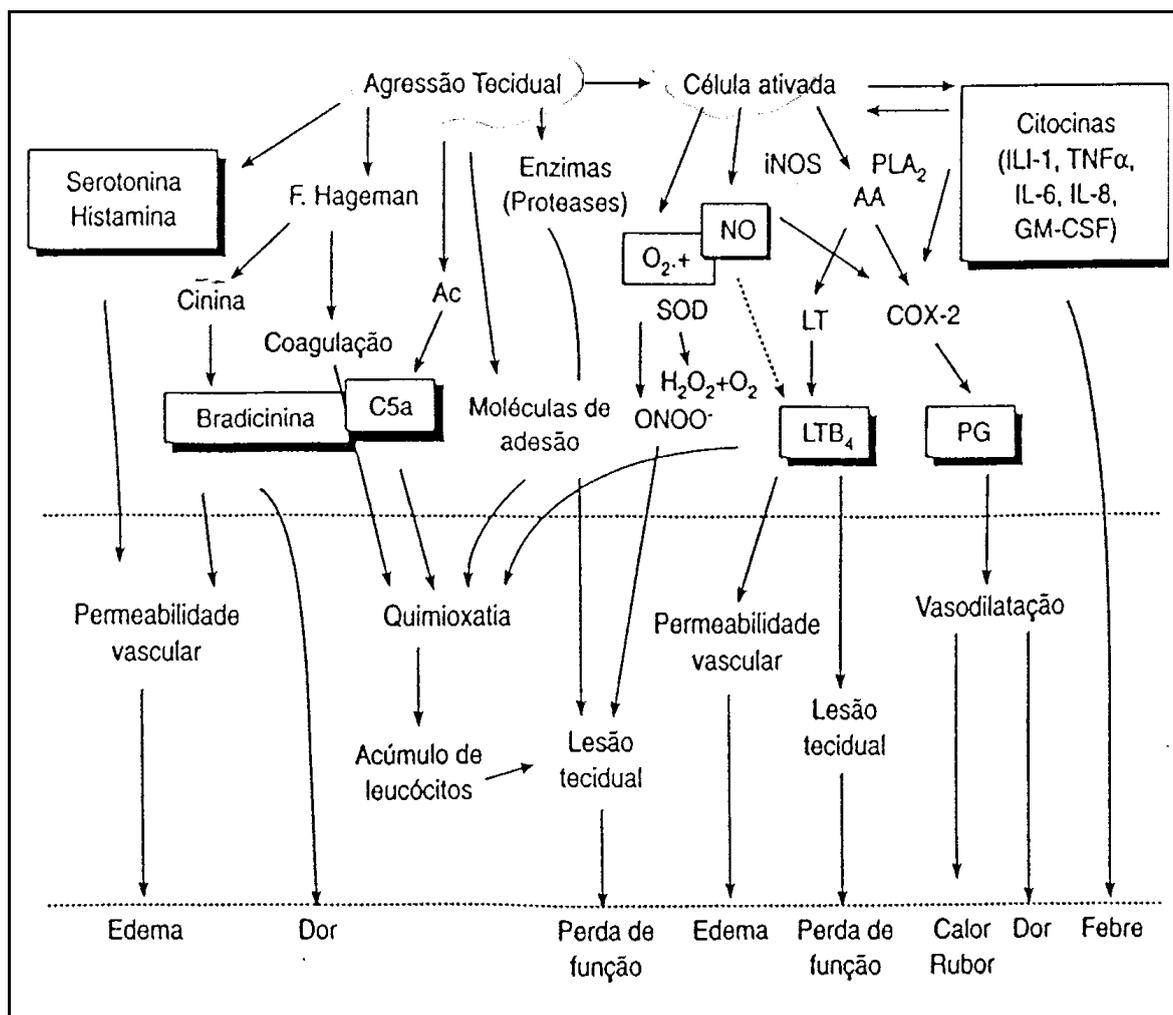
A IL-1 quando secretada em baixas concentrações, funciona como mediador da inflamação local. Atua sobre as células endoteliais para aumentar a expressão das moléculas de superfície que medeiam à adesão leucocitária, tal como os ligantes para as integrinas. (ABBAS, 2003)

De fato , quando da transformação de monócito em macrófago e na vigência de uma resposta celular a substâncias estimulantes de membrana, observa-se a produção e liberação de vários produtos, dentre eles os EROS (espécie reativas de oxigênio) resultantes de uma seqüência de reações bioquímicas de alto consumo de oxigênio conhecidas coletivamente como “oxidative burst” (COHN,1968 e 1978).

Especificamente, o aumento do metabolismo de oxigênio resulta em diversos metabólitos, dentre os quais os mais estudados são o superóxido e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Este último é conhecido por ser o principal componente do aparato microbicida dos neutrófilos e também, de macrófagos ativados. Assim, a mensuração dos níveis de liberação de  $H_2O_2$  a partir dos macrófagos, pode ser considerada como relevante parâmetro para avaliação da ativação destes fagócitos (NATHAN; ROOT, 1977; ROOT *et al.* 1975).

Os macrófagos ativados também secretam espécies reativas de nitrogênio. Dentre destas, o óxido nítrico (NO), tem despertado maior interesse científico pela recente descoberta de seu relevante papel na defesa celular contra infecções virais, parasitárias e bacterianas (KRONCKE; FEHSEL; KOLB-BACHOFEN, 1998) e também, contra células tumorais (CUI *et al.* 1994). A respeito sabe-se que o NO é também um dos mediadores da inflamação, tendo sido primeiramente descrito como fator derivado das células endoteliais que causam vasodilatação através da indução de um relaxamento na musculatura do endotélio vascular (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980).

Macrófagos estimulados secretam também grande quantidade de ânion superóxido, radicais hidroxila e oxigênio “singlet” (BADWEY; KARNOSVSKY, 1980; JOHNSTON, 1978; PICK; MIZEL, 1981). Diferentes trabalhos indicam que estas espécies reativas de oxigênio participam dos processos de inflamação, morte celular e tecidual, transformação neoplásica, aterosclerose e envelhecimento (HAMMOND; KONTOS; HESS, 1985). A figura 1 ilustra estes fenômenos.



**Figura 1** – Quadro da representação esquemática da mediação química da resposta inflamatória.

#### 1.4. Sobre a carragenina

A carragenina é um agente flogístico que causa uma reação inflamatória reproduzível e facilmente mensurável, fatos que tem contribuído para mantê-la como principal ferramenta farmacológica

para experimentos que envolvem a análise de processos inflamatórios (DI ROSA, 1971, GARCIA-LEME *et al.*, 1973, LAZZARINI, 2003).

Foram WINTER *et al.*, (1962) que introduziram o modelo da carragenina para estudar o processo inflamatório agudo e os fármacos antiinflamatórios. É sabido que a carragenina causa uma reação inflamatória reprodutível e facilmente mensurável, fato que tem contribuído para mantê-la como o principal irritante usado em estudos ligados a este modelo de inflamação aguda. Diversos trabalhos mostraram que a injeção subcutânea de 0,1ml de uma suspensão de carragenina a 1%, no coxim plantar de ratos, causa edema cujo volume pode ser medido facilmente por meio de plestimografia. Neste modelo foi possível também analisar a evolução do edema medindo-se o volume da pata imediatamente antes e a intervalos de 1 hora após a injeção do irritante. (LAZZARINI *et al.*, 1996, 2001, 2003; GARCIA-LEME *et al.*, 1973) Assim, observa-se que o volume do edema de pata aumenta gradativamente em função do tempo, atingindo um pico de alteração máxima por volta de 2 – 4 horas após a injeção da carragenina. Este modelo de inflamação utilizado para demonstrar o efeito antiinflamatório de muitas drogas como, por exemplo, a dexametasona (BONTA, I.L. *et al.*, em 1977; CHURCH, M.K. & MILLER, P., 1978; ABDEL-SALAM, O.M.E., *et al.*, 2003).

O edema de pata induzido por este irritante teria três fases distintas e seqüenciais. Na primeira fase, haveria uma liberação de histamina e serotonina (nos primeiros 90 minutos da resposta inflamatória) que seriam seguidas, na segunda fase, pela liberação de cininas (corresponde o edema desenvolvido de 1,5 a 2,5 horas após a injeção do flogístico); a terceira fase caracterizada pela liberação das

prostaglandinas (edema desenvolvido de 2,5 a 6 h após a injeção do flogístico). Por outro lado demonstrou pelo uso da indometacina, inibidor da síntese de prostaglandinas a inibição do edema. (WINTER *et al.*, 1962; SEDGWICK, *et al.*, 1983; HARADA *et al.*, 1998);

Em modelos inflamatórios experimentais, como o edema de pata de ratos induzido pela carragenina, observou-se a participação do NO, uma vez que este foi abolido após o tratamento dos animais com um inibidor da síntese de no, o L-NAME (MEDEIROS *et al.*, 1995).

A célula endotelial produz NO, que se difunde para o músculo liso vascular subjacente e regula o tônus muscular. O NO, derivado do endotélio, também se difunde na superfície luminal do endotélio, onde exerce vários efeitos fisiológicos importantes, como o seqüestro de radicais superóxido (GRYGLEWSKI *et al.*, 1986; RUBANY & VANHOUTTE, 1986), inibição da aderência e agregação de plaquetas (RADOMSKI *et al.*, 1987, 1990), modulação da permeabilidade da barreira endotelial (KUBES & GRANGER, 1992) e diminuição da interação leucócito-endotélio (KUBES *et al.*, 1991; DAVENPACK *et al.*, 1994).

Entretanto, alguns trabalhos experimentais sugerem que o NO, em concentrações micromolares, é citotóxico e contribui para lesão celular em várias patologias como o choque hipovolêmico e endotóxico (NAVA *et al.*, 1991). Esses efeitos citotóxicos do NO são atribuídos, principalmente, á expressão da isoforma induzível da o óxido nítrico sintetase (NOS) (LAZZARINI, 2003).

## 1.5. Sobre os métodos citométricos

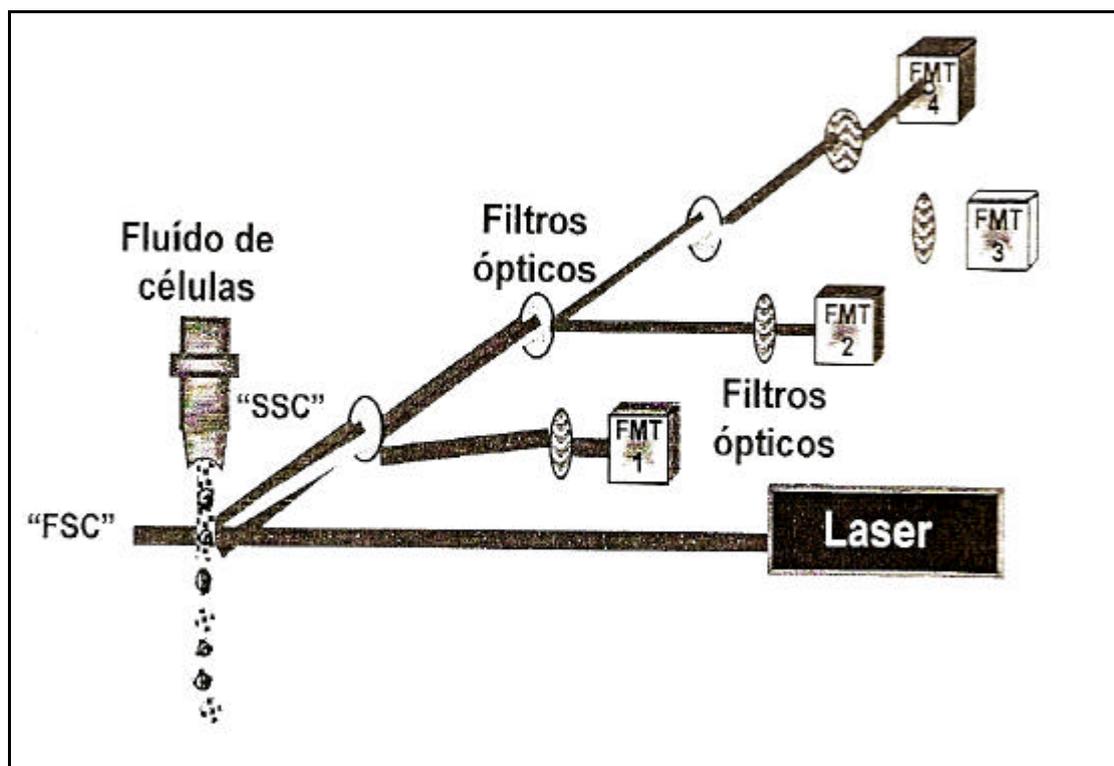
Os métodos citométricos também são considerados convenientes e mais práticos para estudar o *burst* oxidativo celular quando comparado com outras técnicas bioquímicas, uma vez que permitem a diferenciação dos eventos oxidativos intra e extracelulares (BASSOE et al, 1983). No mesmo sentido, o uso da metodologia citométrica elimina a necessidade de separação prévia dos leucócitos, o que é relevante, pois esta separação também ativa *per se* o *burst* oxidativo celular (FEARON; COLLINS, 1983).

É amplo o conhecimento que os neutrófilos produzem espécies reativas do oxigênio (ERO) como peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), radical hidroxil, ânion superóxido e o oxigênio *singlet* (BADWEY; KARNOVSKY, 1980; PICK; MIZEL, 1980); estas são produzidas *in vivo* durante o metabolismo de células aeróbicas ou são produtos de secreção de fagócitos ativados (BADWEY et al., 1980; ROOT; METCALF, 1975). Em ambos os casos resultam de uma seqüência de reações bioquímicas de alto consumo de oxigênio conhecidas como *burst* oxidativo.

Neste contexto, o *burst oxidativo* expresso quando da geração de peróxido de hidrogênio por macrófagos e por neutrófilos estimulados pode ser monitorado quantitativamente por citometria de fluxo, usando-se para tal o reagente o 2'7' diacetato de diclorofluoresceína (DCFH - DA), o *Staphylococcus aureus* marcado com iodeto de propídeo (PI), ou o miristato-acetato de forbol (PMA) (HASUI; HIRABAYASHI; KOBAYASHI, 1989; RAIDAL; BAILEY; LOVE, 1998). Kenton e Brandt (1965) descreveram originalmente um método

fluorométrico para mensuração do peróxido de hidrogênio em solução aquosa (STANKEVICIUS, D., 2004; SILVA, F. R., 2003). Este método baseia-se na oxidação do DCFH - DA não fluorescente, pelo peróxido de hidrogênio e pelas peroxidases, o que o transforma em um composto fluorescente, o 2'7' diclorofluoresceína. Sendo polar, o composto fluorescente não pode difundir-se para fora da célula. Por esta razão, é possível detectar a oxidação do DCFH-DA nos macrófagos utilizando-se análises unicelulares por citometria de fluxo. Neste contexto, sabe-se que a oxidação do DCFH-DA é quantitativamente proporcional á concentração gerada de peróxido de hidrogênio (HIRABAYASHI; TANIUCHI; KOBAYASHI, 1985).

Métodos de citometria de fluxo têm sido amplamente utilizados para estudar as atividades de macrófagos e de neutrófilos em humanos (BASSOE *et al.*, 1983 a, b; ROTHE; VALET, 1990) e em animais (SAAD; HAGELTORN, 1985; JOHANNISSON *et al.*, 1995; MASSOCO; PALERMO-NETO, 2003; SILVA, F. R., 2003) utilizando-se de esferas de látex fluorescentes ou bactérias marcadas com FITC ou PI, fluorocromos que emitem respectivamente uma fluorescência verde ou vermelha.



**Figura 2** – Quadro da representação esquemática dos componentes e do funcionamento do citômetro de fluxo. Os detectores captam a luz do laser, e a lançam sobre os detectores posicionados horizontalmente (FSC) e perpendicularmente (SSC) em relação ao laser, podendo medir mais 3 canais de fluorescência nas diferentes cores: verde, amarelo e vermelho. A figura 2 ilustra os componente e funcionamento do citômetro.

### 1.6. Sobre os mecanismos de ação dos antiinflamatórios:

O mecanismo de ação dos antiinflamatórios não hormonais está relacionado à inibição da migração de polimorfonucleares e de

monócitos. (DI ROSA *et al.*, 1971). Neste sentido, a ação dos salicilatos e drogas relacionadas, no mecanismo fisiopatológico da inflamação, são explicadas de diversas formas. Uma delas seria a possibilidade do bloqueio da formação de prostaglandinas pela inibição sobre a ciclooxigenase (VANE, 1971).

Já se mostrou a existência de pelo menos duas isoformas de ciclooxigenase: a ciclooxigenase 1 (COX 1) e a 2 (COX 2). Mais recentemente foi identificada no cérebro a isoforma ciclooxigenase 3 (COX 3) (CHANDRASEKHARAN, N.V., DAI H., TUREPU ROSS, K.L., *et al.* 2002).

A COX 1 esta sempre presente nos tecidos (constitutiva) principalmente, na mucosa gástrica, fígado, rins e plaquetas. Produtos prostanóides da COX-1 são protetores da mucosa gástrica, mantêm a reperfusão hepática e renal, em condições particularmente de diminuição do fluxo sanguíneo, como na hipovolemia ou hipotensão e na agregação plaquetária. Em contraste, a COX-2 é a principal enzima a ser ativada em células inflamatórias, nervos periféricos e no sistema nervoso central. Existem evidências de aumento da expressão da COX 1, no rim, juntamente apresentando papel fisiológico. (BEICHE, F.; SCEUERER, S.; BRUNE, K. *et al.*, 1996).

A atividade periférica e central da COX 2 aumenta após a inflamação periférica concomitantemente produção da prostaglandina E2, levando a muitos dos sinais associados ao processo inflamatório como dor, calor, e rubor. A prostaglandina E2 contribui para a sensibilização periférica dos receptores de dor. Atualmente, acredita-se que a redução da dor promovida pelos analgésicos antiinflamatórios não esteroidais tenha principalmente origem central e

não apenas por reduzir o processo antiinflamatório (MATHEWS K.L., 2000).

LEWIS e WHITTLE (1977) observaram que os antiinflamatórios não esteróides também são capazes de inibir a liberação de histamina de mastócitos de peritônio de rato. Esses resultados sugerem que a inibição conjunta da prostaglandina e da liberação de histamina contribui bastante para redução do processo inflamatório e do prurido.

Os salicilatos e drogas similares, ao bloquearem a síntese de prostaglandinas, poderiam interferir na migração celular por um duplo mecanismo: supressão do fator de quimiotático, indiretamente, pela redução da contribuição das PGs ao aumento de permeabilidade, minimizando a formação de vários fatores quimiotáticos no exudato plasmático (FERREIRA e VAINE, 1979; HIGGS *et al.*, 1980; TASAKA, A.C., 2006).

Os medicamentos glicocorticóides capazes de inibir a lipooxigenase e a ciclooxigenase possuem ação antiinflamatória superior a dos antiinflamatórios não esteroidais (HIGGS *et al.* 1980). Eles reduzem a permeabilidade do endotélio capilar, evitando, assim, o extravasamento de líquidos e proteínas para fora dos capilares. Dessa forma, evita-se ou diminui-se a formação do edema. Inibem também a marginação e a migração dos leucócitos, evitando que estes se aproximem da área lesada, havendo inclusive, diminuição do número de células que chegam até o local (SILVA, P., 2002, 2005).

Existem indicações de que os glicocorticóides estabilizam a membrana dos lisossomas. Isto faz com que estes se rompam com maior dificuldade evitando assim a liberação de substâncias vasoativas. Também mantêm a integridade da membrana celular,

prevenindo tumefação e destruição celular excessiva (SILVA, P., 2002,2005).

Os glicocorticóides previnem o início da cascata de reação que leva a produção de certas prostaglandinas e leucotrienos, através da diminuição da oferta do ácido araquidônico. Este é liberado dos fosfolípidios da membrana pela fosfolipase A2, que é inibida por proteínas como a macrotina e lipocortina. Neste sentido, o ácido araquidônico é importante na produção dos mediadores humorais da inflamação (SILVA, P., 2002,2005). A Dexametasona é um corticosteróide fluorado sintético com atividade predominante de glicocorticóide de ação prolongada. Apresenta atividade farmacológica 30 vezes maior que a hidrocortisona, com meia vida de 36-72 horas (RANG DALE *et al.*, 2003). Este fármaco é um potente antiinflamatório e imunossupressor que atua inibindo a transcrição de genes que após a tradução originam receptores, proteínas que suprimem citocinas e, também, proteínas que controlam a ativação, migração, adesão e recrutamento celular. Como consequência, ocorre inibição periférica da proliferação de linfócitos T, acompanhada por inibição da migração celular para sítios inflamatórios e controle da recirculação de leucócitos (SORIANELLO, E. *et al.*, 2002).

Os efeitos antiinflamatórios incluem inibição de processos iniciais, como edema, deposição de fibrina, dilatação capilar, movimento fagocítico na área inflamada e atividade fagocítica. Os processos tardios como produção capilar, deposição de colágeno e formação de quelóide também são inibidos pelos corticosteróides. A ação total dos corticosteróides é catabólica, tendo atividade sobre todos os tipos de reações inflamatórias, sejam elas causadas por

patógenos invasores, por estímulos químicos ou físicos ou por respostas imunes inadequadamente desencadeadas, como as observadas na hipersensibilidade ou na doença auto-imune (ANDRADE, M.M.J.; MARCO, V., 2006).

Outra ação destes medicamentos é a inibição da formação dos leucotrienos que é de suma importância, pois estes compostos produzem quimiotaxia de neutrófilos, aderência ao local inflamatório, aumenta de permeabilidade vascular, bronco e vasoconstricção. Adicionalmente, os esteróides podem, também, afetar diretamente a expressão de moléculas de adesão; neste sentido, e como já foram dito, estas moléculas desempenham um papel fundamental no tráfego de células inflamatórias para o local da inflamação. (CRONSTEIN *et al.* 1992). Esta ação dos corticóides diferencia-se grandemente da ação dos antiinflamatórios não hormonais, já que estes não interferem na produção dos leucotrienos, sendo estes agentes menos potentes, porque reduzem a formação apenas de prostaglandinas. Através da supressão da ciclooxigenase. (SILVA, P., 2002,2005)

### **1.7 Sobre a *Nepeta cataria***

A *Nepeta Cataria* é uma erva perene pertencente à família da menta (*Laminaceae*), a qual é encontrada nas regiões centrais e sudeste Europeu, crescendo na beira das estradas, achada também em regiões selvagens dos Estados Unidos, sul do Canadá, sul da África e região central do sudeste Asiático.

Muitas das espécies da *Nepeta* são usadas na medicina popular (SMITHERMAN, L.C. *et al.*, 2005), através de seus efeitos anti-

sépticos, adstringente, antitussígenos, anti-espasmódicos, anti-asmáticas, anti-térmicas, diuréticas, analgésicas ( SMITHERMAN, L.C. *et al* , 2005; MICELI, N. *et al* , 2004; AYDIN, S. *et al* , 1998; OSTERHOUDT, K.C. *et al* , 1997). Além desses efeitos MICELI, M. *et al* relataram o efeito antiinflamatório do extrato e frações da *Nepeta sibthorpii Bentham*, em 2004, trazendo aos pesquisadores mais um efeito destas plantas. Creditou-se ao ácido ursólico juntamente com os polifenóis, e epinepetalactona, a responsabilidade pela ação antiinflamatória em diferentes níveis do processo inflamatório.

Alguns estudos da *Nepeta Cataria* demonstraram mudanças no comportamento de diferentes espécies animais. Assim, MASSOCO *et al* (1992 e 1995) demonstram alterações comportamentais em camundongos devido à interferência em sistemas dopaminérgicos. BERNARDI, M.M. *et al.* (1994); MASSOCO, C.O. *et al.*, (1991); HATCH, C.R. *et al*, (1972) e PALEN, F.G. *et al* (1966) demonstraram os efeitos alucinógenos em gatos e camundongos; e MAIRESSE, M. (1981), HART, L.B. *et al* (1985), OSTERHOUDT, L.K. *et al* (1997), SHERRY, C.J. *et al* (1978); e JACKSON, B. *et al*, (1969) os efeitos sedativos. Além disto, o consumo de ração a 10% com as folhas de *Nepeta cataria* potencia a ereção peniana induzida por apomorfina (GIOVANNI *et al*, 2006) e promove efeitos antidepressivos (SENDER; BERNARDI, 1998).

O exame histológico das folhas da *Nepeta Cataria* (REGNIER, F.E. *et al*, 1968), mostrou a existência de estruturas glandulares, as quais contem um óleo essencial cujas substâncias são: a nepetalactona (50%), o ácido nepetálico (33%) e a fração neutra viscosa (14%). Os óleos essenciais estão mais presentes nas folhas e

flores podendo produzir sintomas similares a aqueles descritos para a maconha e ácido lisérgico (JACKSON, B. & REED, A., 1969). Neste sentido, recentemente, trabalho de nosso grupo mostrou que o óleo essencial das folhas desta planta apresenta efeitos analgésicos potentes (RICCI, 2006).

A utilização das ervas da família das Lamiaceas, em particular das Nepetas, na medicina popular para as diferentes patologias e processos, despertou o interesse dos pesquisadores a estudar mais profundamente as diferentes ações das diferentes espécies dessa planta, como o efeito: anti-bacteriana, anti-viral, antifúngica, anti-sépticas, antitussígenas, e antiinflamatório. (ABRAHAM, Z. *et al* 1986) Tentando determinar qual a parte da planta e qual o composto químico que leva a essas ações.

MICELE *et al* (2005) detectou efeitos antiinflamatórios nas partes aéreas de *Nepeta sibthorpii* *Benth*, uma planta da família das Nepetas endêmica da Grécia. Estes autores observaram inibição do processo inflamatório no edema de pata induzido e mostraram a existência também uma atividade anti-oxidativa, atribuindo ao ácido ursólico este efeito.

Desde que não existem estudos acerca da atividade antiinflamatória da *N.cataria* e plantas desta família apresentam esta atividade, estudou-se neste trabalho o possível efeito antiinflamatório desta planta. Optou-se por empregar o extrato apolar da planta baseados em MICELE *et al* (2005) que relataram que as substâncias responsáveis por estes efeitos estavam presentes nesta fração.

Para tanto, foram utilizadas ratas da linhagem Wistar tratados com diferentes doses do extrato, e analisaram-se: a atividade do *burst*

oxidativo, a capacidade de fagocitose, e a possível atividade antiinflamatória no edema de pata induzido pela carragenina lambda 1% destes animais.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos Gerais:-

Estudar o efeito antiinflamatório da fração apolar do extrato de *Nepeta cataria* em ratas Wistar.

### 2.2 Objetivos Específicos:

Avaliação do efeito antiinflamatório do extrato apolar de *Nepeta cataria* em ratas por meio dos seguintes experimentos:

1. Determinação do efeito antiinflamatório no modelo de edema de pata induzido pela carragenina a 1%, nas doses de 25mg, 50mg 100mg/kg, e comparação entre si e com o efeito de 1 mg/kg da dexametasona.
2. Validação da dose com efeito antiinflamatório por meio da avaliação da geração de *burts* oxidativo de capacidade de fagocitose de macrófagos peritoneais por citometria de fluxo .
3. Comparação do efeito antiinflamatório de 100mg/kg da fração apolar do extrato das folhas de *Nepeta cataria* com 1mg/kg de dexametasona em edema de pata induzido por carragenina 1% por meio de estudos histológicos na fase aguda de 4 horas (fase de maior inflamação), comparando com o grupo controle.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Animais:**

Foram utilizadas ratas da linhagem Wistar, fêmeas, com idade variando de 70 a 80 dias e peso corporal entre 180 e 220g. Os animais, provenientes do Biotério Central do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP), SP, foram utilizados em conformidade com as normas e procedimentos éticos relativos ao uso de animais de laboratório do Departamento de Patologia da FMVZ-USP e do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) - USP.

Os animais foram alojados em caixas plásticas de polipropileno (modelo B.A.G.), medindo 41 x 34x 16 cm onde terá 5 ratas pôr caixa, devidamente acondicionadas em sala cuja temperatura e umidade foram mantidas aproximadamente constantes (entre 22 e 25°C e 65 a 70 % , respectivamente) por meio de aparelhos de ar condicionado, ventilação e sistemas de exaustão bem como de iluminação artificial, em um ciclo de claro-escuro de 12 horas, iniciando-se a fase clara as 7:00 horas.

A alimentação (ração para roedores – Nuvilab CR1) foi fornecida “ad libitum” aos animais, os quais foram mantidos nestas condições por um período de adaptação de no mínimo 7 dias antes do início de cada experimento; neste período, todos os animais (dos grupos experimentais e controles) foram manuseados a cada 2 dias, a fim de evitar-se, ao máximo, a ocorrência de possíveis situações estressantes durante a fase experimental. Ao final do período de adaptação, todos os ratos foram pesados para controle de peso e/ou

cálculo dos volumes a serem injetadas, de acordo com as doses preconizadas nos experimentos.

### 3.2 Planta:

A *Nepeta Cataria* é uma erva perene pertencente à família da menta (*Lamiaceae*), a qual é encontrada nas regiões centrais e sudeste Europeu, crescendo na beira das estradas, achada também em regiões selvagens dos Estados Unidos, sul do Canadá, sul da África e região central do sudeste Asiático.

Foto 1



Foto 2



Foto 1: [runeberg.org/nordflor/92.html](http://runeberg.org/nordflor/92.html)

Foto 2: [biodiversity.georgetown.edu/images/Nepeta-cat...](http://biodiversity.georgetown.edu/images/Nepeta-cat...)

<http://biodiversity.georgetown.edu.cfm?view=all&IDNumber=2518>

Fotos retiradas do site de busca google - imagens

### 3.3 Extração e isolamento do extrato:

A planta foi coletada em Piracicaba, mantidas em cultura por hidroponia, o que garante uniformidade das condições ambientais, em maio de 2005. Um exemplar da planta está depositado no Herbário Municipal de São Paulo sob o tombo PMSP8986, tendo sido reconhecido pela Profa. Oriana Fávero, Universidade Presbiteriana Mackenzie. Para a obtenção do extrato apolar de *N.cataria* as folhas da planta foram secas à temperatura ambiente e a seguir moída. A extração foi feita com  $\text{CHCl}_2$ . Foi utilizada para a extração da massa total de planta 3.194,38g sendo o rendimento do extrato apolar de: 23,48g.

### 3.4 Fármacos e reagentes:

Tween 80 (Sigma®):

- solução utilizada para diluição do extrato da *nepeta cataria*

Dexametasona 1mg/kg (ÀCHE®-Decadron®):

- medicamento indicado como antiinflamatório

Solução de Carragenina (Sigma®) 1%:

- Carragenina 0,01g;
- Solução de Ringer (Aster®) q.s.p 100ml.

- Agente flogístico, substância utilizada para induzir a resposta inflamatória.

Solução para o Plestimógrafo:

- Lauril Sulfato de Sódio (Merck®) 0,5g;
- Cloreto de Sódio (Nuclear®) 0,5g;
- Água destilada q.s.p 1000ml

-solução utilizada no plestimógrafo

Solução de PBS – Salina Tamponada com Fosfato:

-Solução isotônica - Solução utilizada para coleta do líquido peritoneal dos animais utilizados nas técnicas de *burst* oxidativo, fagocitose e NO e utilizada para veículo de diluição para o preparo do extrato da *nepeta cataria*.

Azul de Tripán (Merck®) a 1%:

-Corante de viabilidade celular utilizado para corar as células colhidas no lavado peritoneal

NaCl – Cloreto de sódio 0,9% (Sigma®):

- utilizada para preparo do extrato da *Nepeta cataria*

Vacina Onco BCG (Bacilo de Calmette-Guérin (instituto Butantã de São Paulo, Brasil)) concentração de 8mg/ml:

-Substância utilizada para ativação dos macrófagos peritoneais a serem utilizadas nas técnicas de *burst* oxidativo e fagocitose.

Solução de EDTA (Sigma®) 3mM:

- solução utilizada para interromper a reação após o período de incubação das amostras, com o intuito de reduzir o número de bactérias aderidas á superfície celular.

DCFH-DA (2',7'-Diclorohidrofluoresceína Diacetato (Molecular Probes®):

- Fluorocromo utilizado na técnica de citometria de fluxo para mensuração de *burts* oxidativo

Iodeto de Propídeo (PI (Sigma®)) / *Staphylococcus aureus*:

- Fluorocromo empregado na técnica de citometria de fluxo para marcação da bactéria *Staphylococcus aureus*, no ensaio da fagocitose avaliando assim a atividade fagocítica realizada por macrófagos peritoneais.

### **3.5 Preparo do extrato de *Nepeta cataria* e dexametasona:**

Extrato de *Nepeta cataria*

Para a utilização *in vivo*: O extrato da *Nepeta cataria* foi suspenso em Tween 80, Solução Salina a 0,9% e PBS, para se obter uma solução inicial na concentração de 50mg/ml, (dose esta baseada em Miceli, M. et al., 2004) nas seguintes proporções para diluição do extrato para facilitar a administração IP:

400mg do extrato de *Nepeta cataria*

2ml de Tween 80

2ml de sol. Salina 0,9%

4ml de solução de PBS

Para utilização *in vitro*: O extrato de *Nepeta cataria* foi suspenso em Tween 80, Solução Salina a 0,9% e PBS, para se obter uma solução inicial (Sol. Mãe) na concentração de 10mg/ml, na seguinte proporção: 60mg do extrato de *Nepeta cataria*

1,5ml de Tween 80

1,5ml de sol. Salina 0,9%

3 ml de solução de PBS

A partir dessa suspensão foi realizada a preparação das concentrações utilizadas no experimento da citometria.

Para a concentração de 1 $\mu$ g/ml (solução 1) diluímos:

1 $\mu$ l da solução inicial, mais 999  $\mu$ l de PBS = solução 1 - 1 $\mu$ g/ml.

Para a concentração de 10ng/ml (solução 2) diluímos:

10 $\mu$ l da solução 1, mais 990  $\mu$ l de PBS = solução 2 -10ng/ml.

Dexametasona (para administração *in vivo*)

A dexametasona (Ache®) foi utilizada diretamente da ampola (produto comercial), tendo sido administrado IP na dose de 1mg/kg (BONTA, I.L. *et al.*, em 1977; CHURCH, M.K. & MILLER, P., 1978; ABDEL-SALAM, O.M.E., *et al.*, 2003).

### 3.6 Procedimentos Experimentais:

#### 1. Ativação dos macrófagos peritoneais pelo Onco-BCG:

A substância utilizada para ativar os macrófagos da cavidade peritoneal foi o Onco-BCG, uma substância classicamente reconhecida como tendo esta capacidade ativadora (RAPPOLEE;

WERB, 1990). O Onco-BCG foi inoculado intraperitonealmente (i.p.) em ratas, na concentração de 40mg/5ml (8mg/ml), sendo aplicado 0,3 ml por animal, sete dias antes da coleta.

## 2. Coleta de células peritoneais:

Os animais foram eutanasiados em câmara saturada de CO<sub>2</sub> e as células peritoneais foram coletadas inserindo 20 ml de uma solução salina tamponada (PBS) na cavidade peritoneal e o mesmo foi coletado por aspiração com a mesma seringa. Este líquido foi colocado em um tubo plástico de 50 ml e foi realizada a contagem de células em câmara de Neubauer. Além da contagem total para ajuste celular nos ensaios, foi realizada a análise de viabilidade celular utilizando o corante azul de tripan.

## 3. Técnica de citometria de fluxo:

Foi utilizado um citômetro de fluxo (*Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA*) conectado com um computador (*Macintosh Apple, CA, USA*). Serão analisados 10.000 eventos utilizando-se o software Cell Quest (*Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA*). As subpopulações celulares serão reconhecidas por meio das propriedades FSC/SSC das mesmas, que são detectores da transmissão ou refração da luz emitida pelas células. Os resultados de fluorescência foram gravados em uma escala logarítmica. A fluorescência verde do DCFH e do FITC fora mensurada a 530±30 nm (detector FL1) e a fluorescência

vermelha do *S. aureus* marcado com o iodeto de propídeo será mensurada a  $585\pm 42$  nm (FL2). A quantificação da capacidade de fagocitose, assim como as análises do *burst* oxidativo foram estimadas pela intensidade média de fluorescência/célula emitida pelo PI, pelo DCFH e pela FITC, respectivamente. A porcentagem de fagocitose (porcentagem de neutrófilos que fagocitaram bactérias) foi calculada através do número de células fluorescentes dividido pelo número total destas células e multiplicadas por 100. As fluorescências do PI e do DCFH foram analisadas utilizando-se compensação de fluorescências para corrigir quaisquer interferências de sinais emitidos pelos mesmos.

#### 4. Medida do *burst* oxidativo e da fagocitose:

O método proposto por HATSUI *et al.* (1989) foi utilizado para a análise do *burst* oxidativo desencadeado pela fagocitose da bactéria *S. aureus* previamente marcada com iodeto de propídeo (PI). Resumidamente, foram adicionados no tubo de polipropileno  $2 \times 10^5$  células peritoneais tubo A, 200  $\mu$ l de DCFH-DA (0,3 mM-Molecular Probes) (tubo B), 100 $\mu$ l de *S. aureus*-PI (Sigma) (tubo C), 100 $\mu$ l de *S. aureus*-PI mais 200  $\mu$ l de DCFH-DA (tubo D) e PBS q.s.p. 1 ml. As amostras foram colocadas em incubação em banho-maria sob agitação a 37°C por 20 minutos. As reações foram interrompidas pela adição de 2,0 ml de solução gelada de EDTA (3mM). A seguir, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 250g e caso fosse necessário os eritrócitos seriam removidos dos botões de leucócitos do sangue periférico por lise hipotônica com uma solução de NaCl 0,2% (2,0 ml) durante 20 segundos. Imediatamente após esta lise foi

colocada uma solução de NaCl 1,6% (2,0 ml) em cada amostra para restaurar a isotonicidade. As amostras foram, então, centrifugadas (250g por 10 minutos) e a lise foi repetida caso fosse necessário. Os botões celulares obtidos foram, então, ressuspensos adicionando-se aos tubos 500  $\mu$ l de uma solução de EDTA resfriado (3mM). A magnitude do *burst* oxidativo e a capacidade de fagocitose foram avaliadas por citometria de fluxo.

### Foto 3



- Citômetro de fluxo (*Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA*), conectado com um computador (*Macintosh Apple, CA, USA*). Aparelho concedido pelo laboratório do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

#### 4. Medida do edema inflamatório:

O volume do coxim plantar foi avaliado através do método da pletismografia, utilizando-se para tanto um pletismógrafo digital (Plethysmometer-Ugo Basile, Itália). A primeira medida do volume da pata foi realizada imediatamente antes da administração do agente flogístico (carragenina); as demais medidas foram realizadas em tempos determinados conforme descrito a seguir, sendo os resultados expressos em milímetros.

A indução da resposta inflamatória foi realizada pela inoculação, com uma agulha hipodérmica com dimensões de 0,45mm x 13 mm marca BD (26 G<sup>1/2</sup>), de carragenina lambda (1%) no coxim plantar do animal, sendo o volume a ser utilizado de 0,1ml. Essa substância foi preparada imediatamente antes do seu emprego. O pletismógrafo foi calibrado com solução de sulfato de Na<sup>+</sup> (dodecil) 0,5g, NaCl 0,5g em 1 litro de água destilada.



**Figura 3** - Imagem de o coxim plantar de rata; local de aplicação da carragenina lambda 1%, marcado em vermelho e indicado com a seta.



**Figura 4** - Imagem do aparelho de plestimografia (Plethysmometer-Ugo Basile®, Itália), que faz a leitura do volume da pata.



**Figura 5** - Imagem do início da introdução da pata para fazer a medida volumétrica da pata, com a marca feita na articulação tarsiana para termos como base para realização das medidas.

## 5. Coleta de fragmento do tecido inflamatório da pata

A resposta inflamatória foi induzida pela injeção de carragenina conforme descrito anteriormente, Os animais foram submetidos à eutanásia na câmara de CO<sub>2</sub>, 4 (quatro) horas após a injeção do agente flogístico para colheita do tecido da pata, horário este considerado como pico para o desenvolvimento do edema.

Os tecidos colhidos foram armazenados em um recipiente e fixados em formol a 10% por 5 dias, posteriormente desidratados em soluções alcoólicas crescentes, diafanizadas em xilol e emblocadas em parafina, onde foram feitos cortes de 5µm para produção das lâminas silanizadas para posterior análise histológica.

#### **4. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

O software utilizado para a realização de todos os procedimentos estatísticos foi o SPSS (Statistical Package for Social Sciences) versão 13.0 para Windows, 2005.

Para a análise estatística dos dados de edema de pata, empregou-se ANOVA univariada. O teste de Scheffé foi empregado para comparação dos grupos experimentais e do controle entre si.

Para análise dos dados da citometria foi empregada a ANOVA univariada seguida pelo teste de Tuckey Kramer. Em todos os casos a probabilidade de  $p < 0,05$  foi considerada capaz de revelar diferenças significantes entre os grupos.

## 5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS

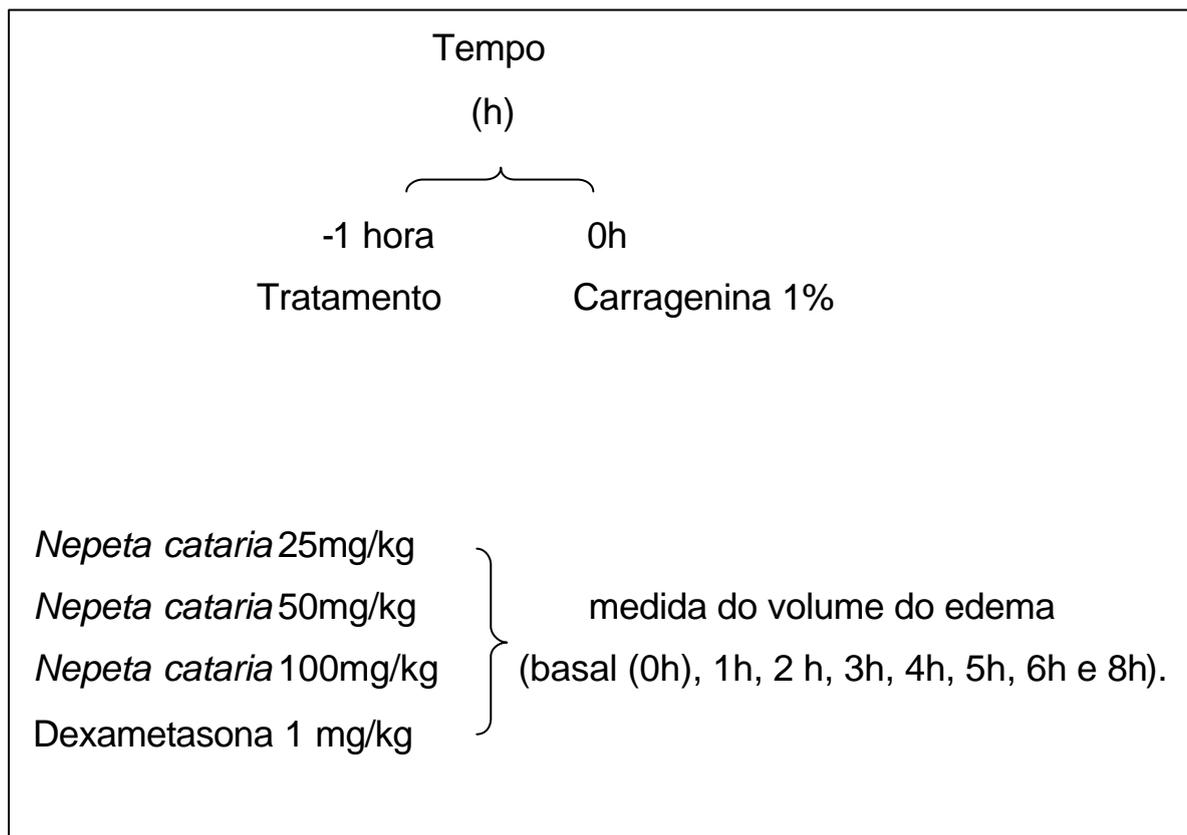
### 5.1 Experimento 1 – Avaliação do efeito antiinflamatório da fração apolar do extrato das folhas de *Nepeta cataria* sobre o edema de pata

Foram utilizadas 50 ratas Wistar divididas em 5 grupos como se segue:

- Grupo controle (GC) - administrado por via intraperitoneal (I.P.) com o veículo utilizado para suspensão do extrato apolar de *Nepeta cataria*.
- Grupo experimental 1 (GE1) - 25mg/kg da fração apolar (FP) do extrato da *Nepeta cataria* suspenso em Tween 40 e PBS, administrado por via intraperitoneal (I.P.);
- Grupo experimental 2 (GE2)- 50mg/kg da fração apolar (FP) do extrato da *Nepeta cataria* suspenso em Tween 40 e PBS, administrado por via intraperitoneal (I.P.);
- Grupo experimental 3 (GE3) - 100mg/kg da fração apolar (FP) do extrato da *Nepeta cataria* suspenso em Tween 40 e PBS, administrados por via intraperitoneal (I.P.);
- Grupo experimental 4 (GE4) - dexametasona 1mg/kg administrada por via intraperitoneal (I.P.);

Uma hora após a injeção IP nos grupos experimentais (GE1, GE2, GE3, e GE4) e controle (GC), os animais foram injetados no

coxim plantar com a carragenina 1% para observação do desenvolvimento do edema. O esquema da figura 6 abaixo ilustra protocolo experimental.



**Figura 6** – Quadro esquemático do protocolo experimental de edema de pata

## Resultados

A ANOVA indicou que houve diferenças significantes entre os grupos (1 hora- $F(4/45) = 8,5$ ,  $p < 0,0001$ ; 2 horas-  $F(4/45) = 8,80$ ,  $P < 0,0001$ ); 3 horas –  $F(4/45) = 12,45$ ,  $p < 0,0001$ ; 4 horas-  $F(4/45) = 19,37$ ,  $p < 0,0001$ ; 5 horas-  $F(4/45) = 25,70$ ,  $p < 0,0001$ ; 6 horas –  $F(4/45) = 13,17$ ,  $p < 0,0001$ , 8 horas-  $F(4/45) = 22,88$ ,  $p < 0,0001$ ).

O teste de Scheffé aplicado em cada hora de observação mostrou que na primeira, segunda, terceira, quarta e sexta hora o edema de patas dos animais tratados com as doses de 50 e 100 mg/kg do extrato de *N.cataria* e 1 mg/kg de dexametasona foi significantemente menor que dos animais do grupo controle. Nestes momentos não foi detectada diferença significativa entre o edema de pata dos animais do grupo controle e dos animais tratados com 25 mg/kg do extrato apolar de *N.cataria*.

Na quinta e oitava hora de observação todos os animais tratados com as doses de 50mg/kg e 100mg/kg do extrato da planta e dexametasona apresentaram menor edema de pata em relação aos animais do grupo controle.

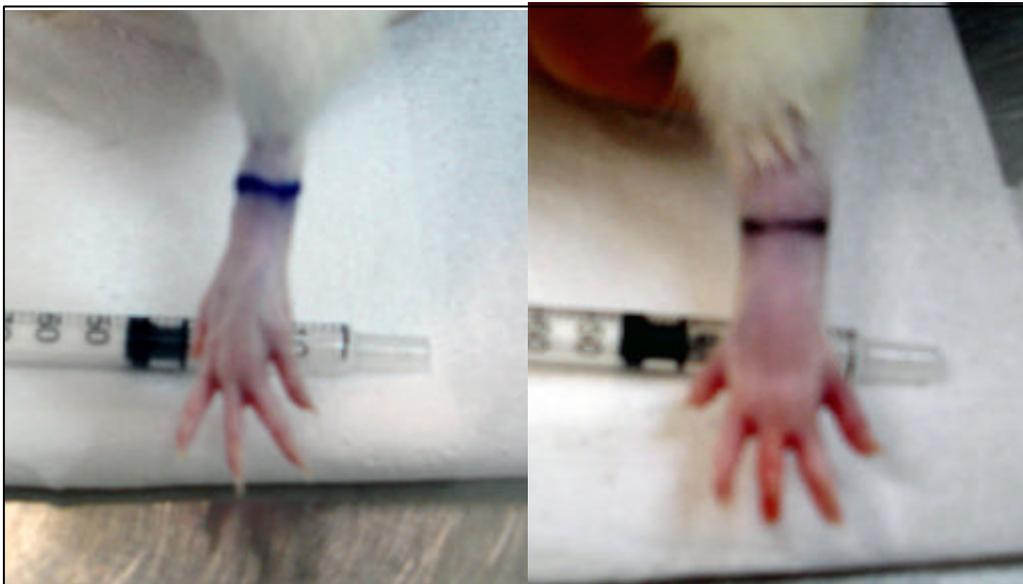
Observou-se ainda uma relação dose e tempo dependente nos efeitos antiinflamatórios do extrato da planta. Assim, verificou-se que na dose de 25 mg/kg somente foram observadas diferenças significantes após a quinta hora de observação em relação aos animais do grupo controle. Por outro lado, nas doses de 50 e 100 mg/kg observou-se diferenças a partir da primeira hora de observação sendo que os efeitos foram mais intensos na maior dose. Nota-se ainda que o efeito do extrato fora duradouro, pois até na oitava hora

de observação o efeito antiinflamatório estava presente. Finalmente, de forma geral, os efeitos da dose de 100 mg/kg do extrato foi comparável à da dexametasona os quais estes resultados são mostrados na tabela 1.

A tabela 2 mostra e a figura 9 ilustra a diferença entre o diâmetro volumétrico inicial e final de cada grupo. Nota-se que os resultados são similares àqueles apresentados na tabela 1.

Adicionalmente compararam-se os dados obtidos dos grupos controle, 100 mg/kg do extrato e dexametasona (Fig. 8). Nota-se que tanto o edema de pata como a diferença entre o volume inicial e final em cada momento dos animais do grupo tratado com 100 mg/kg do extrato como aqueles tratados com dexametasona não diferiram entre si; porém ambos apresentaram menor volume do edema quando comparados aos animais do grupo controle.

A análise dentro dos grupos indicou que o pico de efeito inflamatório induzido pela carragenina ocorreu na quarta hora (4 horas após) da administração do agente flogístico. Em todos os momentos o edema de pata de ratas tratadas com a dose de 25 mg/kg não diferiu significativamente daquele dos animais tratados com 50 mg/kg. Com relação à dose de 100 mg/kg, o edema de pata de animais tratados com a dose de 25 mg/kg foi maior em todos os momentos de observação. A comparação das doses de 50 mg/kg e 100 mg/kg indicou que estes grupos diferiram significativamente apenas na oitava hora de observação.



Tempo de leitura

Lb

T4

**Figura 7** - Imagem da pata de rata, com marcação no tarso para medida no plestimógrafo, no tempo Lb (basal) e no tempo 4 (4 horas após aplicação da carragenina 1%).



**Figura 8** - Imagem das patas retiradas para realização da fixação no formol para realização da histologia.

**Tabela 1.** Efeitos da administração de *N. cataria* no edema de pata de ratas induzido pela carragenina. As doses do extrato apolar de *N. cataria* foram 25mg/kg (grupo G1), 50mg/kg (grupo G2), 100mg/kg (grupo G3) e da dexametasona 1mg/kg (grupo G4); os animais do grupo controle (grupo C) receberam uma suspensão de PBS em Tween 80. A carragenina a 1 %, (1ml) foi administrada no coxim plantar esquerdo de todos os animais. São apresentadas as médias e respectivos erros-padrão do diâmetro volumétrico da pata medido em milímetros. N= 10/grupo.

Tempo (h)	GRUPOS				
	C	GE1	GE2	GE3	GE4
Lb	1,07 ± 0,02	1,06 ± 0,01	1,09 ± 0,03	1,10 ± 0,02	1,07 ± 0,02
1	1,49 ± 0,03	1,41 ± 0,06	1,38 ± 0,03 <sup>a</sup>	1,32 ± 0,05 <sup>c</sup>	1,37 ± 0,09 <sup>b</sup>
2	1,58 ± 0,03	1,44 ± 0,04	1,39 ± 0,04 <sup>b</sup>	1,33 ± 0,07 <sup>c</sup>	1,33 ± 0,07 <sup>c</sup>
3	1,66 ± 0,04	1,54 ± 0,09	1,47 ± 0,04 <sup>b</sup>	1,34 ± 0,07 <sup>c</sup>	1,30 ± 0,06 <sup>c</sup>
4	1,71 ± 0,03	1,55 ± 0,08	1,46 ± 0,04 <sup>c</sup>	1,43 ± 0,06 <sup>c</sup>	1,23 ± 0,07 <sup>c</sup>
5	1,63 ± 0,04	1,48 ± 0,07 <sup>a</sup>	1,38 ± 0,04 <sup>c</sup>	1,26 ± 0,05 <sup>c</sup>	1,22 ± 0,07 <sup>c</sup>
6	1,55 ± 0,02	1,41 ± 0,08	1,33 ± 0,04 <sup>c</sup>	1,23 ± 0,04 <sup>c</sup>	1,20 ± 0,06 <sup>c</sup>
8	1,50 ± 0,02	1,33 ± 0,06 <sup>c</sup>	1,30 ± 0,04 <sup>c</sup>	1,19 ± 0,04 <sup>c</sup>	1,15 ± 0,06 <sup>c</sup>

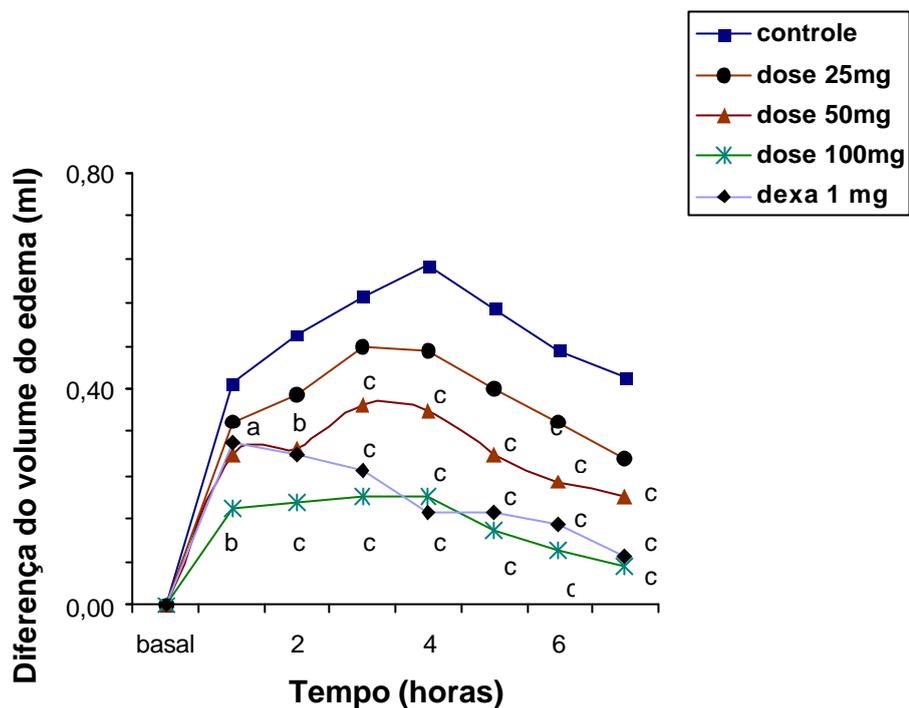
<sup>a</sup>-p<0.05; <sup>b</sup>-p<0.01; <sup>c</sup>-p<0,001 em relação ao grupo controle (teste de Scheffé).

**Tabela 2** - Efeito da administração de *Nepeta cataria* no edema de pata de ratas induzido pela carragenina. São apresentadas as diferenças de volume entre os valores basais e da medida no momento de cada grupo. As doses do extrato apolar de *Nepeta cataria* foram 25mg/kg, 50mg/kg, 100mg/kg, i.p.; da dexametasona 1mg/kg e os animais do grupo controle receberam uma suspensão de PBS em Tween 80. A carragenina a 1 %, 1ml foi administrada a no coxim plantar esquerdo de todos os animais. As medidas do volume da pata foram feitas 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 8 horas após a administração de carragenina. São apresentados as médias e os respectivos erros-padrão do diâmetro volumétrico da pata medido em milímetros. N=10/grupo.

Grupos

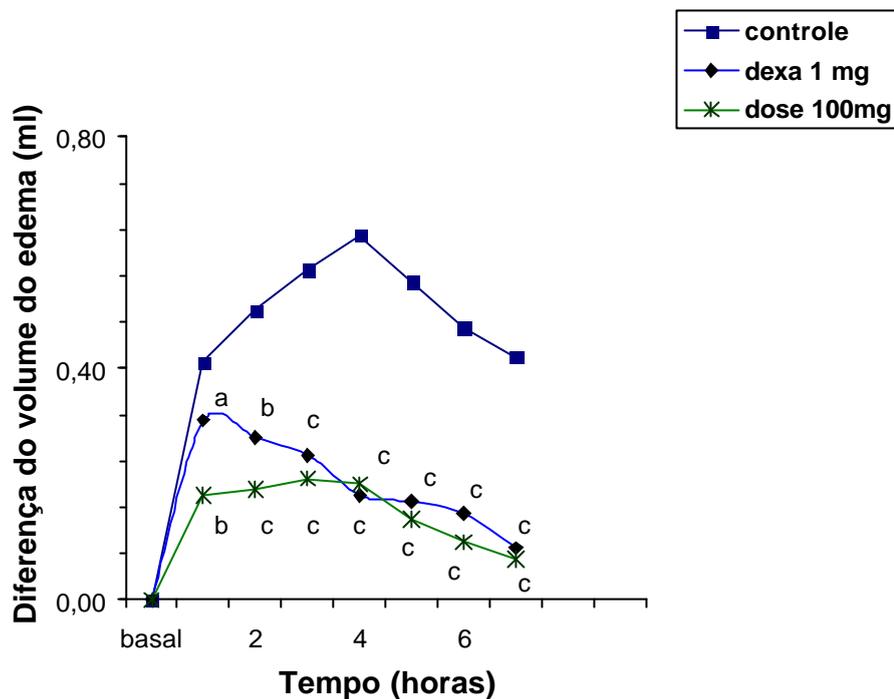
Tempo (h)	Controle		Experimentais		
	Placebo	<i>N.cataria</i>			Dexametasona
	1ml/kg	25mg/kg	50mg/kg	100mg/kg	1mg/kg
1 hora	0,41±0,03	0,34±0,04	0,28±0,03 <sup>a</sup>	0,18± 0,04 <sup>b</sup>	0,30±0,09 <sup>a</sup>
2 horas	0,50±0,04	0,39±0,05	0,28±0,04 <sup>b</sup>	0,19 ± 0,05 <sup>c</sup>	0,28±0,06 <sup>b</sup>
3 horas	0,57±0,04	0,48±0,07	0,37±0,04 <sup>c</sup>	0,20 ±0,04 <sup>c</sup>	0,25±0,05 <sup>c</sup>
4 horas	0,63±0,03	0,47±0,07	0,36±0,04 <sup>c</sup>	0,20 ±-0,04 <sup>c</sup>	0,17±0,06 <sup>c</sup>
5 horas	0,55±0,04	0,39±0,05 <sup>a</sup>	0,28±0,04 <sup>c</sup>	0,14 ± 0,03 <sup>c</sup>	0,17±0,05 <sup>c</sup>
6 horas	0,47±0,04	0,33±0,06	0,23±0,04 <sup>c</sup>	0,10 ± 0,02 <sup>c</sup>	0,15±0,04 <sup>c</sup>
8 horas	0,42±0,03	0,27±0,04	0,20±0,03 <sup>c</sup>	0,07 ± 0,02 <sup>c</sup>	0,09±0,04 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>-p<0.05; <sup>b</sup>-p<0.01; <sup>c</sup>-p<0,001 em relação ao grupo controle (teste de Scheffé).



.<sup>a</sup>- $p < 0.05$ ; <sup>b</sup>- $p < 0.01$ ; <sup>c</sup>- $p < 0,001$  em relação ao grupo controle (teste de Scheffé).

**Figura 9** - Efeito da administração de *Nepeta cataria* no edema de pata de ratas induzido pela carragenina. São apresentadas as diferenças de volume entre os valores basais e da medida no momento de cada grupo. As doses do extrato apolar de *N. cataria* foram 25mg/kg, 50mg/kg, 100mg/kg, i.p.; da dexametasona 1mg/kg e os animais do grupo controle receberam uma suspensão de PBS em Tween 80. A carragenina a 1 %, 1ml foi administrada a no coxim plantar esquerdo de todos os animais. As medidas do volume da pata foram feitas 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 8 horas após a administração de carragenina. São apresentadas as médias do diâmetro volumétrico da pata medido em milímetros. N= 10/grupo. \*- $p < 0.05$ ; em relação ao grupo controle (teste de Scheffé)



<sup>a</sup>- $p < 0,05$ ; <sup>b</sup>- $p < 0,01$ ; <sup>c</sup>- $p < 0,001$  em relação ao grupo controle (teste de Scheffé).

**Figura 10** - Efeito da administração de *N. cataria* no edema de pata de ratas induzido pela carragenina. São apresentadas as diferenças de volume entre os valores basais e da medida no momento de cada grupo. A dose do extrato apolar de *N. cataria* de 100mg/kg, i.p.; e da dexametasona 1mg/kg e os animais do grupo controle receberam uma suspensão de PBS em Tween 80. A carragenina a 1 %, 1ml foi administrada no coxim plantar esquerdo de todos os animais. As medidas do volume da pata foram feitas 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 8 horas após a administração de carragenina. São apresentadas as médias do diâmetro volumétrico da pata medido em milímetros. N= 10/grupo. \*  $< 0,05$  em relação ao grupo controle.

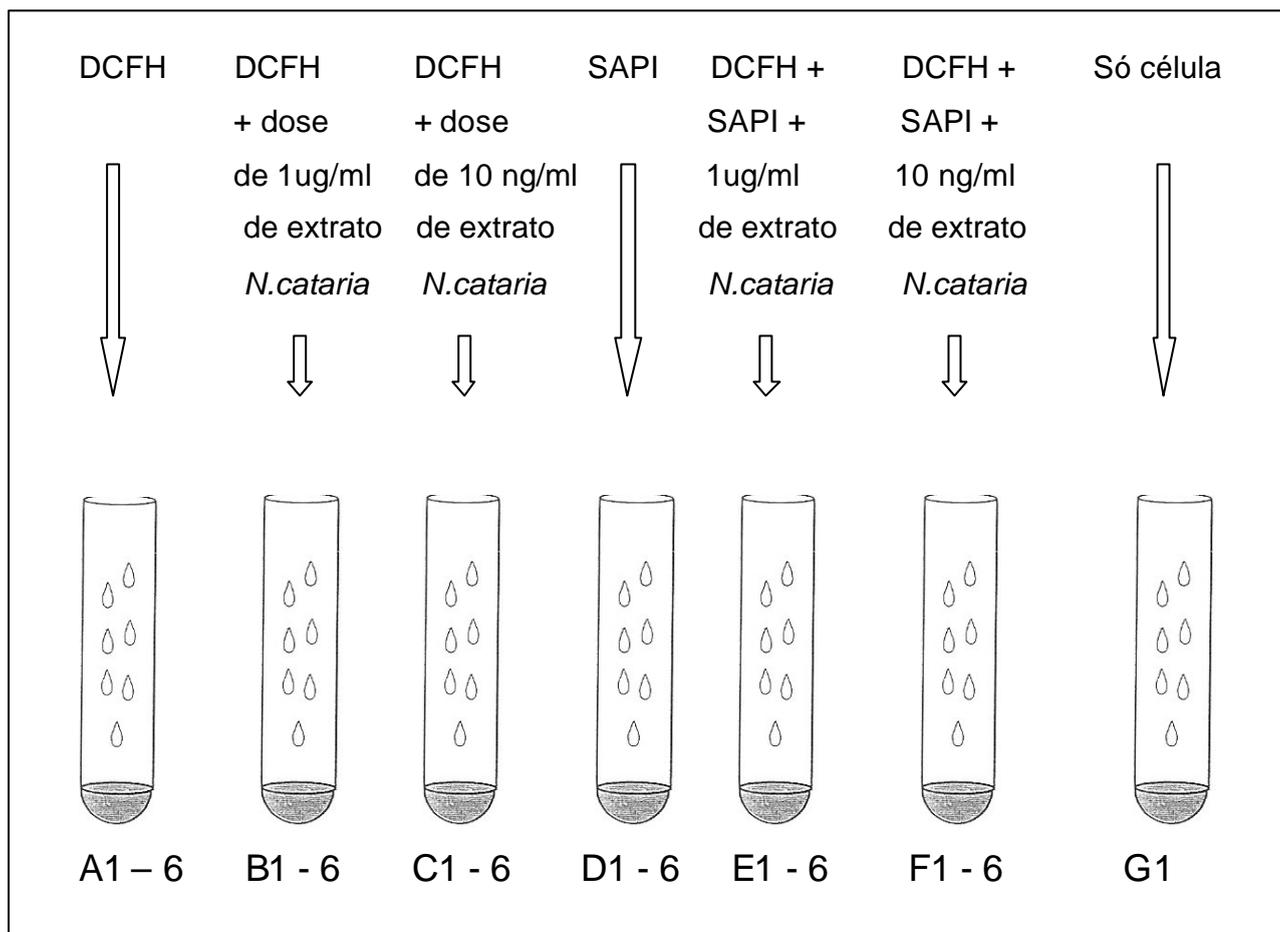
## **5.2 Experimento 2 – Estudo *in vitro* com o extrato apolar de *N. cataria* para verificação da dose com efeito antiinflamatório por meio da geração de *burst* oxidativo e da capacidade de fagocitose de neutrófilos sanguíneos por citometria de fluxo.**

### Delineamento experimental

Foram utilizadas 3 ratas Wistar as quais após eutanásia em câmara de CO<sub>2</sub>, coletou-se o líquido peritoneal injetando-se por via i.p. 20 ml de PBS com auxílio de uma seringa de 20 ml e agulha de calibre 30X7 mm. Realizou-se uma massagem da cavidade e o lavado peritoneal foi coletado por aspiração com a mesma seringa. Este líquido foi colocado em um tubo plástico de 15 ml para realização de um *pool* de células peritoneais e contagem das mesmas para equalizar uma quantidade de células igual a  $1 \times 10^6$  / ml.

Abaixo segue o esquema utilizado e a figura com a representação esquemática das reações:

- 6 tubos só com DCFH para controle,
- 6 tubos com DCFH acrescido da dose de 1 micrograma/ml,
- 6 tubos com DCFH com a dose de 10 ng/ml,
- 6 tubos só com SAPI para controle,
- 6 tubos com DCFH mais SAPI com a dose de 10 ng/ml,
- 6 tubos com DCFH mais SAPI com a dose de 1ug/ml,
- 1 (um) tubo só com célula.



**Figura 11** - Quadro da representação esquemática da seqüência de reagentes utilizados na técnica de burst e fagocitose

O teste estatístico ANOVA univariada indicou que houve diferenças significantes entre os grupos de 1µg e de 10ng dentro de dos dois experimentos realizados (replicado). Os resultados estão apresentados neste trabalho.

O teste de Scheffé aplicado em cada experimento mostrou que em relação à intensidade de fagocitose a dose de 1 µg promoveu um aumento comparado com a dose de 10ng/kg do extrato de *N.cataria* e foi significativamente menor que dos grupos controle (tabela3).

A TABELA 3 mostra os dados da análise por citometria dos efeitos da exposição de células *in vitro* ao extrato de *N. cataria* na segunda replicação do experimento. A ANOVA aplicada entre os grupos para o DCFH indicou a existência de diferenças entre os grupos ( $F(2/297) = 23,88$ ,  $p < 0,001$ ). O teste de comparações múltiplas indicou que houve redução do *burst* basal e induzido pela fagocitose na dose de 1  $\mu\text{g}$  do extrato.

A porcentagem ( $F(2/297) = 10434$ ,  $p < 0,0001$ ) e intensidade de fagocitose ( $F(2/297) = 69,50$ ,  $p < 0,0001$ ) bem como o *burst* induzido pela fagocitose ( $F(2/297) = 22,11$ ,  $p < 0,0001$ ) dos grupos tratados com o extrato apresentaram-se alterados.

O teste de Tuckey-Kramer, aplicado entre os grupos tratados com o extrato e o controle mostrou que ocorreu redução significativa na porcentagem de fagocitose dos animais do grupo experimental e controle nas duas doses empregadas; o mesmo foi observado para a intensidade de fagocitose. A comparação entre os grupos mostrou que o *burst* foi significativamente reduzido após ambos os tratamentos em relação ao grupo controle.

A tabela 3 mostra e a figura 12 ilustra estes resultados.

A tabela 4 mostra e a figura 13 ilustra a diferença entre os dois experimentos de grupo (replicação).

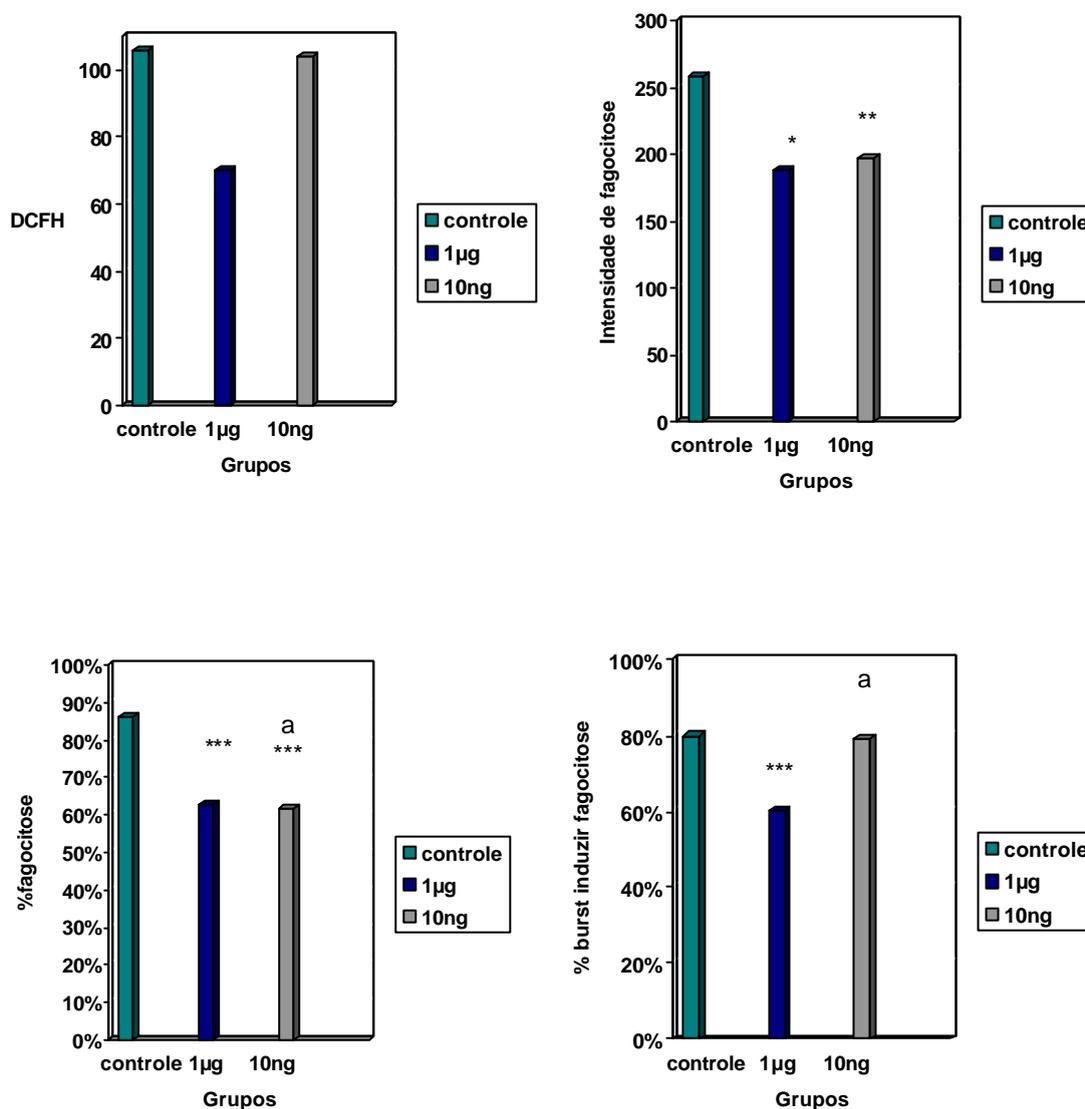
A análise dentro dos grupos indicou que a dose de 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$  de *Nepeta cataria* demonstrou um efeito antiinflamatório devido à diminuição da geração de *burst* oxidativo nos animais tratados com a planta.

## Resultados

**Tabela 3** - Efeito das doses de 1 µg/kg e 10 ng/kg do extrato da *N.cataria* sobre as células peritoneais de ratas sobre geração de *burst* oxidativo, e da capacidade de fagocitose, avaliando a porcentagem, e intensidade de fagocitose, *burst* basal e *burst* induzido comparado com o controle.

Parâmetros	Controle	Experimentais <i>Nepeta cataria</i>	
		1µg	10ng /kg
Somente DCFH	90±14,27	78±15,20	92±5,75
% fagocitose DCFH+SAPI	80%±0,09***	69%±0,09***	63%±0,03*** <sup>a</sup>
Intensidade de Fagocitose DCFH+SAPI	143%±5,45	129%±4,41*	125%±1,50**
%Burst após Fagocitose DCFH+SAPI	77%±0,07	61%± 0,05***	80%±3,63 <sup>a</sup>

\*p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\*p<0,001 em relação ao grupo controle. <sup>a</sup>p<0,001 em relação a 1µg. ANOVA seguida pelo teste de Tukey-Kramer.



\* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao grupo controle. <sup>a</sup>  $p < 0,001$  em relação a 1µg. ANOVA seguida pelo teste de Tukey-Kramer.

**Figura 12** – Demonstração gráfica dos resultados do 1º experimento replicado comparando as duas doses de 1µg e 10ng/kg comparados ao controle. \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle (ANOVA seguida pelo Teste de Tuckey-Kramer).

A TABELA 4 mostra os dados da análise por citometria de fluxo dos efeitos da exposição de células *in vitro* ao extrato de *N. cataria* da primeira replicação do experimento. A ANOVA aplicada entre os grupos para o DCFH não indicou a existência de diferenças entre os grupos ( $F(2/297) = 0,367$ ,  $p=0,629$ ). No entanto, a porcentagem ( $F(2/297) = 13041$ ,  $p < 0,0001$ ) e intensidade de fagocitose ( $F(2/297) = 5,214$ ,  $p < 0,0059$ ) bem como o burst gerado após a fagocitose ( $F(2/297) = 23,74$ ,  $p < 0,0001$ ) dos grupos tratados com o extrato apresentaram-se alterados.

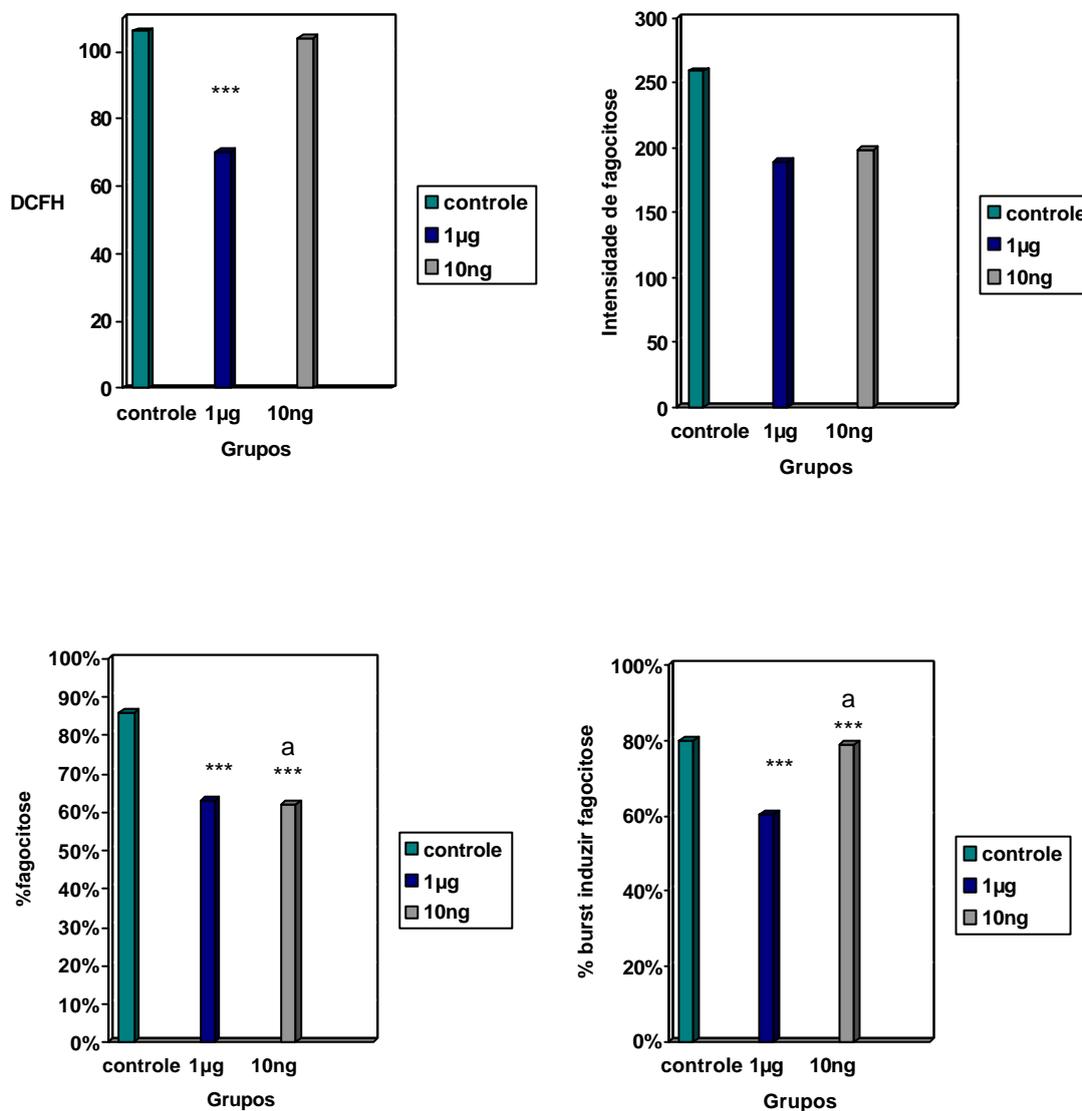
O teste de Tuckey-Kramer, aplicado entre os grupos tratados com o extrato e controle mostrou que ocorreu redução na porcentagem de fagocitose dos animais do grupo experimental e controle; o mesmo foi observado para a intensidade de fagocitose.

A comparação entre os grupos mostrou que o *burst* induzido pela fagocitose foi reduzido apenas após a dose de 1  $\mu\text{g}$  em relação ao grupo controle.

**Tabela 4.** Efeito das doses de 1 µg/kg e 10 ng/kg do extrato da *N. cataria* sobre as células peritoneais de ratas na geração de *burst* oxidativo e da capacidade de fagocitose. São apresentadas as porcentagem e intensidade de fagocitose, *burst* basal e *burst* induzido em comparação ao grupo controle.

Parâmetros	Grupos		
	Controle	Experimentais <i>Nepeta cataria</i>	
		1 µg	10ng /kg
Somente DCFH	106 ± 4,63	70±4,16 ***	104±3,56
% fagocitose DCFH+SAPI	86%±0,15	63%±0,16***	62%±0,07*** a-
Intensidade de fagocitose DCFH+SAPI	259%±0,13	189%±7,06	198%±35,65
%Burst Induzir Fagocitose DCFH+SAPI	80%±0,083	60%± 3,5***	79%±2,23*** a-

\*\*\*p<0,001 em relação ao grupo controle. p<0,001 em relação ao grupo 1 µg ANOVA seguida pelo teste de Tuckey-Kramer.



\* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao grupo controle. <sup>a</sup>  $p < 0,001$  em relação a 1µg. ANOVA seguida pelo teste de Tuckey-Kramer.

**Figura 13** – Demonstração gráfica dos resultados do 2º experimento comparando as duas doses de 1µg e 10 ng/kg comparados ao controle. \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle (ANOVA seguida pelo Teste de Tuckey-Kramer).

**5.3 Experimento 3. Comparação do efeito antiinflamatório da dose de 100mg/kg da fração apolar do extrato das folhas de *Nepeta cataria*, com 1mg/kg de dexametasona em edema de pata induzido por carragenina 1%, por meio de estudos histológicos no período de 4 horas(fase de maior inflamação), após a inoculação da carragenina 1 %, comparando com o grupo controle.**

#### Delineamento experimental

Foram utilizados 9 ratas as quais foram submetidas aos mesmos procedimentos realizados para avaliação de edema de pata, sendo divididas em 3 grupos como se segue:

Grupo controle (GC)- 3 animais receberam o veículo do extrato apolar de *Nepeta cataria* I.P., 1 hora antes da inoculação da carragenina. Após 4 horas foram submetidos à eutanásia e coletada uma amostra do tecido inflamado da pata;

Grupo experimental 2 (G2)- 3 animais receberam 100mg/kg, I.P., do extrato apolar de *Nepeta cataria* uma (1) hora antes da inoculação da carragenina. Após 4 horas foram submetidos à eutanásia e coletada uma amostra do tecido inflamado da pata;

Grupo experimental 3 (G3) - 3 animais receberam 1mg/kg de dexametasona, I.P., 1 hora antes da inoculação da carragenina. Após 4 horas foram submetidos à eutanásia e coletada uma amostra do tecido inflamado da pata.

## Análise qualitativa

Foram atribuídos parâmetros a serem avaliados para análise qualitativa, das lâminas histológicas obtidas pelo corte do tecido celular subcutâneo do coxim plantar posterior esquerdo de ratas, inoculados com carragenina a 1 %, obtidas em cada grupo (GC, G2, G3):

A = infiltrado celular polimorfonuclear

B = infiltrado celular mononuclear

C = grau de distensão / dissociação do tecido conjuntivo(derme) (= edema)

D = marginação leucocitária

E = dilatação de vasos linfáticos

Escore para cada parâmetro:

Discreto +

Moderado ++

Severo +++

Muito severo ++++

## Resultados

Na análise qualitativa observou-se no grupo controle, severo infiltrado de células polimorfonucleares, discreto infiltrado de mononucleares, severa distensão / dissociação do tecido conjuntivo, na marginação leucocitária, bem como na dilatação de vasos linfáticos.

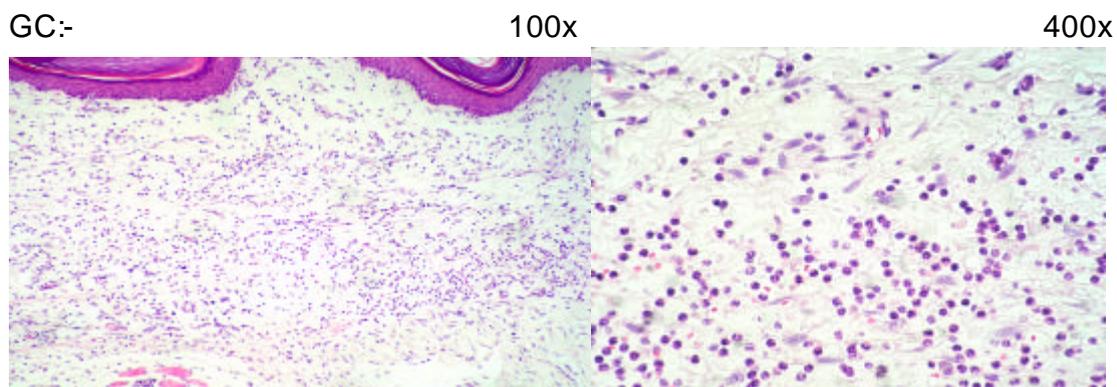
No grupo dos animais tratados com a dose de 100 mg/Kg do extrato apolar de *N. cataria*, observou-se severo infiltrado de células polimorfonucleares, discreto infiltrado de mononucleares, moderada distensão / dissociação do tecido conjuntivo, na marginação leucocitária, bem como na dilatação de vasos linfáticos.

No grupo dos animais tratados com a dose de 1mg / Kg de dexametasona, observou-se de discreto à moderado infiltrado de células polimorfonucleares, ausência de infiltrado de células mononucleares, e discretas distensão / dissociação do tecido conjuntivo, na marginação leucocitária, bem como na dilatação de vasos linfáticos. ( Figura 14 e foto micrografia 1, 2, e 3).

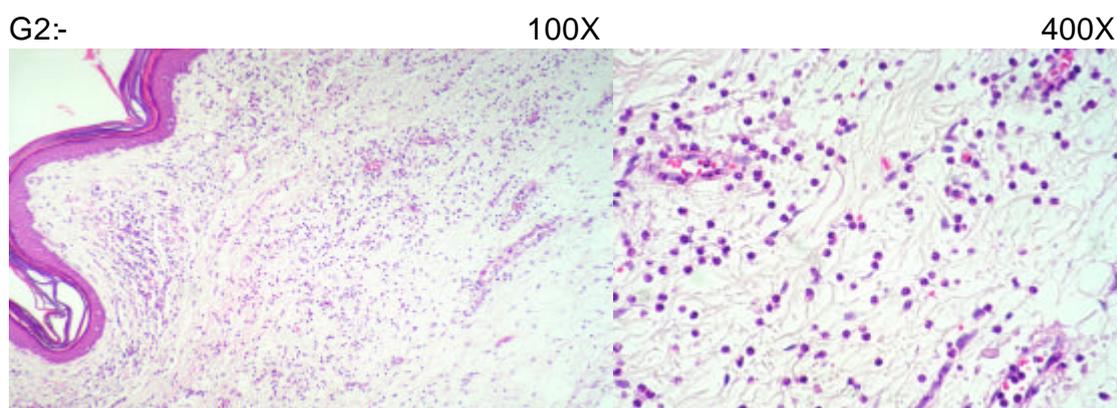
As análises qualitativas corroboram os resultados obtidos na plestimografia. Sendo que os animais tratados com a dose de 100mg/kg do extrato apolar de *N. cataria* B, apresenta clara redução da distensão do tecido conjuntivo provocado pelo edema, mas aparentemente não há alteração na migração celular. (figura 14)

	Grupo Controle GC	Grupo <i>N.cataria</i> 100 mg / kg G 2	Grupo Dexametasona 1 mg / Kg G 3
A	+++	+++	++
B	+	+	-
C	+++	++	+
D	+++	++	+
E	+++	++	+

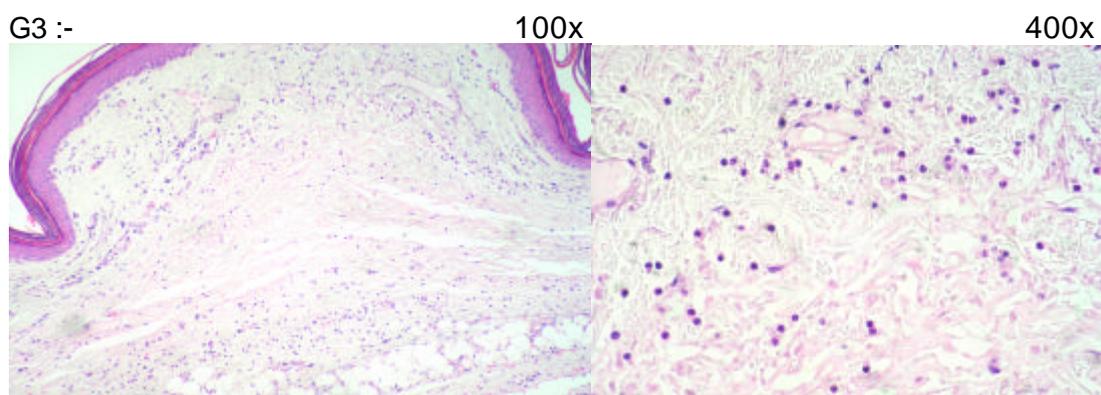
**Figura 14** – Quadro de resultados da análise qualitativa obtidas nos grupos (G C, G. 2, G 3), para os diferentes parâmetros e seus respectivos escores.



**Fotomicrografia 1:** Corte histológico do tecido celular subcutâneo do coxim plantar posterior esquerdo de ratas; coloração Hematoxilina e Eosina (HE), visualizadas no aumento de 100x e 400x.



**Fotomicrografia 2:** Corte histológico do tecido celular subcutâneo do coxim plantar posterior esquerdo de ratas tratadas com o extrato apolar de *N.cataria* (100mg/Kg); coloração Hematoxilina e Eosina (HE), visualizadas no aumento de 100x e 400x.



**Fotomicrografia 3:** Corte histológico do tecido celular subcutâneo do coxim plantar posterior esquerdo de ratas tratadas com dexametasona (1mg/Kg) coloração Hematoxilina e Eosina (HE), visualizadas no aumento de 100x e 400x.

## 6. DISCUSSÃO

Os presentes resultados mostraram que a *N.cataria* apresentou efeito antiinflamatório no edema de pata induzido pela carragenina, de modo, semelhante ao observado por MICELI, N. *et al* em 2005, com outra planta do mesmo gênero, a *Nepeta sibthorpii Bentham*. De fato, as doses de 50 e 100 mg/kg do extrato da planta impediram o desenvolvimento do edema.

A resposta inflamatória consiste de dois componentes principais que são a reação vascular e a celular (ROBBINS, S.L.; COTRAN, R.S.; KUMAR, V., 2005). Os modelos experimentais empregados no presente trabalho tiveram como objetivo a análise destes componentes. Para verificar o efeito antiinflamatório da *N. cataria*, fizemos a avaliação do edema de pata após a inoculação da carragenina, que teve como objetivo, analisar a reação vascular enquanto que, a geração do *burst* oxidativo e a fagocitose buscaram verificar a resposta celular.

A carragenina é um agente flogístico que causa uma reação antiinflamatória reproduzível e facilmente mensurável, fatos que tem contribuído para mantê-la como principal ferramenta farmacológica para experimentos que envolvem a análise de processos inflamatórios (DI ROSA, 1971, GARCIA-LEME *et al.* 1973, LAZZARINI, 2003).

O edema de pata induzido por este irritante teria três fases distintas e seqüenciais. Na primeira fase, haveria uma liberação de histamina e serotonina (nos primeiros 90 minutos da resposta inflamatória) que seriam seguidas, na segunda fase, pela liberação de cininas (corresponde o edema desenvolvido de 1,5 a 2,5 horas após a

injeção do flogístico); a terceira fase caracterizada pela liberação das prostaglandinas (edema desenvolvido de 2,5 a 6 h após a injeção do flogístico). Por outro lado demonstrou pelo uso da indometacina, inibidor da síntese de prostaglandinas a inibição do edema. (WINTER *et al.*, 1962; SEDGWICK, *et al.*, 1985; HARADA *et al.*, 1998);

Os presentes resultados concordam com esta assertiva, uma vez que a injeção subcutânea de 0,1ml de uma suspensão de carragenina a 1% no coxim plantar de ratos reproduziu um edema, cujo volume aumentou gradativamente em função do tempo, atingindo um pico máximo por volta de 2 a 4 horas após a injeção da mesma.

Nossos resultados demonstraram também que o efeito antiinflamatório foi dose e tempo resposta dependente. De fato observa-se que das 3 doses empregadas do extrato, 25, 50 e 100 mg/kg. A mais eficiente, com efeito mais significativo foi a de 100 mg/kg, seguindo-se a de 50, e com efeitos muito menores a dose de 25 mg/kg. Além disto, a inibição do edema promovido pela dose de 100 mg/kg foi comparável àquela de 1 mg/kg de dexametasona.

O componente celular da reação inflamatória é representado por leucócitos que migram para os tecidos adjacentes lesionados. Estes leucócitos, mobilizados a partir da corrente sanguínea e dos compartimentos de reserva, migram a superfície dos vasos da micro circulação da área que circundam a lesão (passam a deslizar sobre o endotélio – comportando “rolling”) e, posteriormente, aderem à parede do vaso. A seguir, essas células migram para o meio externo através de junções interendoteliais (diapedese), locomovendo-se de forma orientada no sítio extravascular em resposta a um gradiente de concentração de mediadores inflamatórios (quimiotaxia) acumulando-

se no local da lesão (FLOREY,1970; MAJNO & JORIS, 1996, COTRAN *et al.*, 1999)

Conforme já salientado, a reação inflamatória é caracterizada pela liberação de vários mediadores inflamatórios, que alteram a função da microvasculatura, coordenam o extravasamento de componentes do plasma, e o recrutamento de leucócitos. Basicamente, os mediadores são de origem celular (eicosanóides, histamina, serotonina, óxido nítrico, fator ativador de plaquetas, citocinas e outras proteínas leucocitárias) ou plasmática (cininas, sistema complemento e sistema de coagulação) ( ROCHA E SILVA & GARCIA-LEME, 1972; FERREIRA & VANE, 1973).

Neste sentido, na primeira fase do processo inflamatório induzido pela carragenina deve-se à liberação de histamina e serotonina e ocorre nos primeiros 90 minutos após a inoculação. Segue-se pela segunda fase pela liberação de cininas, em particular a bradiginina. Descrita, há muitos anos, como auto fármacos envolvido com a anafilaxia, a histamina ( $\beta$ -aminoetimidazol) é uma amina formada pela carboxilação do aminoácido histidina (LAZZARINI, 2006; SEDGWICK, 1985; SCHAYER, 1963) e esta presente no interior de mastócitos, basófilos, plaquetas, células endoteliais e neurônios (HILL *et al.*,1990).

Sabe-se que os efeitos farmacológicos causados pela histamina são conseqüentes à sua ligação com pelo menos três receptores farmacológicos distribuídos amplamente no organismo (HILL *et al.*, 1997). Tais receptores são denominados de H<sup>1</sup> (ASH & SCHILD, 1996), H<sup>2</sup> (BLACK *et al.*, 1972) e H<sup>3</sup> (ARRANG *et al.*, 1983).

Nas células endoteliais vasculares a ativação dos receptores H<sup>1</sup> desencadeia aumento de permeabilidade vascular (particularmente

nas vênulas pós-capilares) (MILLER & SIMS, 1986), síntese de prostaciclina (JOHNSON *et al.*, 1985), síntese de fator de agregação plaquetária (PAF) (MCINTYRE *et al.*, 1985) e liberação de óxido nítrico (NO) (IGNARRO, 1990).

A histamina é liberada em resposta a vários estímulos, dentre eles frações de complemento, neuropeptídeos e citocinas, induzindo a moderada vasodilatação e incremento na permeabilidade microvascular. (MELLO & LAURINDO, 2000), isso decorre devido aos principais mediadores inflamatórios do sistema complemento são as proteínas C3 e C5.

Serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT) tem ações semelhantes à histamina e está presente nas plaquetas e células enterocromafins, sendo uma amina vaso ativa com grande participação no processo inflamatório (GARCIA LEME *et al.*, 1973; KANETA *et al.*, 1984; QU *et al.*, 1991 e ELWOOD *et al.*, 1994). Seus receptores farmacológicos estão largamente distribuídos no organismo e são subdivididos em pelo menos três classes principais: 5-HT<sup>1</sup>, 5-HT<sup>2</sup>, e 5-HT<sup>3</sup> (BRADLEY *et al.*, 1986). A ativação destes receptores é capaz de relaxar ou estimular a musculatura lisa, de influenciar a liberação de noradrenalina pelos nervos adrenérgicos e de estimular a produção de NO pelas células endoteliais (BRADLEY *et al.*, 1986; PEACH *et al.*, 1985). A sua liberação acontece quando agregados plaquetários entram em contato com colágeno, trombina, difosfato de adenosina (ADP) e complexos antígenos-anticorpo.

A bradicinina é um nonapeptídeo de importante ação inflamatória. Uma vez no plasma sangüíneo, a meia vida deste auto fármaco é de apenas 15 segundos, sendo rapidamente degradada pela cininase II.

É interessante notar que a cininase II no contexto do estudo da hipertensão é denominada de enzima conversora de angiotensina (ERDÖS & MARCIC, 2001).

Está bem estabelecido que os efeitos da bradicinina sejam conseqüentes à ativação de pelo menos dois tipos de receptores, quais sejam B<sup>1</sup> e B<sup>2</sup> (LAZZARINI, 2003; REGOLI, D; BARBARÉ, J., 1980). Admita-se que os receptores B<sup>2</sup> relacionam-se com os efeitos inflamatórios da bradicinina, visto serem os moduladores da vasoconstricção, hiperalgesia, síntese de eicosanóides, aumento da permeabilidade vascular e liberação oxido nítrico, e citocinas (LAZZARINI, 2003; STERANKA, *et al.*, 1989; DRAY & PERKINS, 1993).

Uma das vias mais importantes da síntese de bradicinina se faz pela ativação do fator de Hageman. Sob determinado estímulos, tais como alterações de pH ou na presença de cargas negativas, o fator de Hageman é ativado, desencadeando reações enzimáticas que culminam na produção de bradicinina (ERDÖS, 1966; REGOLI, D; BARBARÉ, J., 1980; PROUD, D.; KAPLAN, A. P., 1988; LAZZARINI, 2003). De fato, estudos realizados por KUMAMURA *et al.* (1987, 1988) indicam que a bradicinina tem importante participação na modulação da permeabilidade vascular na inflamação induzida por carragenina e caolim em ratos.

Neste sentido, as prostaglandinas e os leucotrienes (LT), também chamados de eicosanóides, são derivados do metabolismo do ácido aracdônico e, liberados, agem ou atuam em uma variedade de processos biológicos, incluindo a inflamação. Podem mediar diferentes passos da inflamação: (PGE<sup>2</sup>) e prostaciclina são importantes na

vasodilatação inflamatória, e potenciam o aumento da permeabilidade vascular e da quimiotaxia promovidas por outros mediadores. (WILLIAMS, K. L.; HIGGS, G. A., 1988; WILLIAMS, T. J.; MORLEY, J., 1973; WILLOUGHBY, D. A. , 1968; MONCADA, S. & VANE, 1979)

A inflamação aguda é uma resposta rápida do hospedeiro a uma injúria, no presente trabalho pode-se considerar a inoculação da carragenina, a qual deflagra a resposta inflamatória que se constitui de: 1- alterações no calibre vascular levando a um aumento do fluxo sanguíneo local; 2- mudanças estruturais na microvasculatura que permite o extravasamento de proteínas plasmáticas e o influxo de leucócitos e 3- acúmulo de leucócitos no foco da injúria e a ativação local dos mesmos (ROBBINS & COTRAN, 2005).

Frente aos diversos mecanismos envolvidos no processo inflamatório a partir da análise histológica realizada nos tecidos após a inoculação da carragenina e, conforme análise descrita para o experimento 3, é possível sugerir que os efeitos do extrato da *N. cataria* tenha sido em decorrência de suas ações sobre o extravasamento de proteínas plasmáticas mais do que no impedimento do influxo de leucócitos. Isto porque a análise histológica demonstrou não haver uma diferença significativa no influxo de leucócitos quando comparados os animais que receberam o extrato da planta com os animais controle. Contudo, na análise histológica a qual avalia o edema foi possível observar uma diferença entre estes mesmo grupos, sendo menor para o grupo que recebeu o extrato da planta e mais intenso para o que recebeu a dexametasona.

A partir desta análise foi também possível verificar a potência dos efeitos antiinflamatórios da dexametasona e do extrato da planta,

uma vez que o extrato da planta seguiu na mesma direção, contudo não com a mesma potência que este antiinflamatório esteroidal. Isto porque a dexametasona foi capaz de diminuir o edema e o influxo de leucócitos ao local da injeção da carragenina e o extrato da planta apenas interferiu com o edema levando à um discreto infiltrado de células mononucleares com moderada distensão do tecido conjuntivo e moderada marginação leucocitária, mas não no processo como um todo.

A dexametasona, neste trabalho, foi empregada como controle positivo, pois é um corticosteróide fluorado sintético com atividade predominante de glicocorticóide de ação prolongada. Apresenta atividade farmacológica 30 vezes maior que a hidrocortisona, com meia vida de 36-72 horas (RANG DALE *et al.*, 2003). Este fármaco é um potente antiinflamatório e imunossupressor que atua inibindo a transcrição de genes que após a tradução originam receptores, proteínas que suprimem citocinas e, também, proteínas que controlam a ativação, migração, adesão e recrutamento celular. Como consequência, ocorre inibição periférica da proliferação de linfócitos T, acompanhada por inibição da migração celular para sítios inflamatórios e controle da recirculação de leucócitos (SORIANELLO, E. *et al.*, 2002).

As análises por pletismografia e a quantitativa mostraram o clássico efeito da dexametasona, ou seja, uma potente redução do efeito antiinflamatório e inibição da migração de polimorfonucleares. Para que os mecanismos de ação do efeito antiinflamatório do extrato apolar da *N. cataria* pudessem ser descritos, concordamos que outros modelos experimentais deveriam ter sido avaliados, pois se sabe que

os efeitos antiinflamatórios de determinadas substâncias envolvem desde o bloqueio de receptores, inativação de enzimas, menor expressão de moléculas de adesão, entre muitos outros e que poderiam ser alvos da ação de substâncias presentes no extrato desta planta (RANG DALE *et al.*, 2003).

Desta maneira, nossos experimentos não nos permitem determinar o(s) mecanismo(s) de ação do extrato desta planta, mas ao menos permite demonstrar, nos modelos empregados, um efeito antiinflamatório envolvendo o componente vascular, uma vez que o edema é uma conseqüência diretamente relacionada com a ação de mediadores da inflamação nas células endoteliais (ROBBINS & COTRAN, 2005). A indução do edema causado por carragenina envolve mecanismo relacionado com a síntese de prostaglandinas, em especial PGE<sub>2a</sub> e PGF<sub>2a</sub> (WINTER *et al.*, 1962; WILLOUGHBY, D. A., 1968; GARCIA - LEME *et al.*, 1973; WILLIAMS, T. J.; MORLEY, J., 1973; MONCADA & VANE, 1979; HARADA *et al.*, 1998; WILLIAMS, K. L.; HIGGS, G. A., 1988). Desta maneira, queremos crer que a dosagem destes eicosanóides em um modelo experimental com a carragenina e utilizando animais tratados com o extrato apolar da *N. cataria* possam trazer informações quanto aos mecanismos de ação da mesma. Ainda o emprego de outros modelos envolvendo a dosagem de outros mediadores da inflamação, como por exemplo: a bradicinina, histamina e principalmente moléculas envolvidas na vasodilatação, como por exemplo, o óxido nítrico (Robbins, Cotran, 2005).

Em relação ao estudo dos efeitos *in vitro* do extrato da *N. cataria* no componente celular foi avaliadas a geração do *burst* oxidativo, seja a basal como a induzida pela fagocitose. Os resultados encontrados

corroboram os dados do edema de pata no que diz respeito à maior dose empregada no estudo *in vitro* que foi de 1µg do extrato apolar. A dose de 1µg do extrato apolar foi capaz de diminuir a geração do *burst* oxidativo e da fagocitose nos dois experimentos realizados e a dose de 10 ng interferiu apenas com a capacidade de fagocitose, produzindo um aumento da geração do *burst* oxidativo em um dos experimentos realizados. Esta diminuição representada principalmente pela menor geração de *burst* oxidativo pela dose de 1µg do extrato demonstra uma ação antiinflamatória desta planta, uma vez que o desencadeamento do *burst* oxidativo é uma das primeiras respostas eliciadas pelas células após a indução de uma resposta inflamatória (ROBBINS, COTRAN, 2005).

O fato da dose de 10 ng do extrato apolar da planta ter causado um aumento da geração do *burst* oxidativo, da dose de 1µg ter causado efeito contrário e os efeitos observados no edema de pata, tomados em conjunto, demonstram que os efeitos antiinflamatórios desta planta devem ser decorrentes da diversidade de substâncias presentes neste extrato com diferentes afinidades pelos receptores presentes nas células endoteliais e nos leucócitos. não conferindo um efeito dose-dependente. Esta é uma hipótese a ser considerada uma vez que se trata de um extrato e não de uma substância isolada desta planta e, além disto, os mecanismos celulares envolvidos na geração do *burst* oxidativo e na geração do edema não apresentam a mesma via comum de ativação.

O mecanismo de geração dos radicais de oxigênio (ROs) em grande quantidade e de maneira rápida, ou seja, chamado também de *burst* oxidativo, é uma resposta celular à injúrias que são empregadas

seja em nível de membrana ou intra citoplasmática. Desta maneira, após a fagocitose de bactérias, neutrófilos e macrófagos produzem ROs via a ativação de um complexo enzimático presente na membrana celular chamado coletivamente de NADPH oxidase (CONH, 1968, 1978; PICK, E.; MIZEL, M., 1981; ROHN, T. T., 1999). Este complexo enzimático é o responsável por reduzir as moléculas de oxigênio em radicais de oxigênio, tais com ânion superóxido, peróxido de hidrogênios entre outros. No caso do presente experimento foi utilizada a bactéria para ativar o processo de geração dos ROs, os quais quando presentes em grandes quantidade e persistentes por muito tempo podem causar peroxidação de membrana de outras células e desencadear os efeitos deletérios da resposta inflamatória.

De alguma maneira, seja atuando sobre este complexo enzimático ou na eliminação dos ROs intracelulares, o extrato na dose maior (1µg) foi capaz de diminuir o *burst* oxidativo gerado *in vitro*, fato este que indica um possível efeito antiinflamatório e, que, se somado aos resultados do edema de pata, realizado também neste projeto, o efeito fica mais evidente.

O fato do extrato de *N. Cataria* ter interferido na capacidade de fagocitose não nos possibilita afirmar que a mesma seja capaz de causar um prejuízo na resposta imune, uma vez que este parâmetro não é único na análise global de uma resposta imune. Estes efeitos do extrato podem estar relacionados com mecanismos de polarização da proteína actina que é responsável pela movimentação da membrana celular durante a fagocitose, ou então, modificando os níveis intra citoplasmáticos de cálcio, que é um ânion requerido durante o processo de fagocitose (BENGTSSON *et al*, 1983). Contudo, para

investigarmos mais pontualmente estas hipóteses outros experimentos deveriam ser elaborados.

Tomados em conjunto os dados dos experimentos ora realizados e, mesmo que escasso de literatura pode sugerir que a *N. Cataria* e/ou as plantas do gênero *Nepeta* apresente efeitos antiinflamatórios doses-dependentes e/ou parciais dependendo do modelo experimental avaliado.

## 7. CONCLUSÃO

Este trabalho permite concluir que:

1. O extrato apolar de *N. cataria* promoveu efeito antiinflamatório no modelo de edema de pata induzido pela carragenina à 1%, sendo que: o edema de patas dos animais tratados com as doses de 50 e 100 mg/kg do extrato apolar de *N. cataria* foi significativamente menor que dos animais do grupo controle, podendo assim dizer que se trata de um efeito dose dependente.
2. Na validação da dose com efeito antiinflamatório por meio da avaliação da geração de *burts* oxidativo e da capacidade de fagocitose de macrófagos peritoneais por citometria de fluxo, verificou-se que a dose de 1 µg/Kg apresentou uma redução da geração de *burst* oxidativo nos animais tratados com a planta; o mesmo foi observado para a intensidade de fagocitose, não tendo *in vitro* um efeito dose-dependente.
3. A avaliação do efeito antiinflamatório de 100mg/kg da fração apolar do extrato das folhas de *Nepeta cataria*, no edema de pata induzido por carragenina 1% por meio de estudos histológicos na fase aguda de 4 horas mostrou que as análises qualitativas corroboram os resultados obtidos na plestimografia. Sendo que os animais tratados com a dose de 100mg/kg do extrato apolar de *N. cataria*, apresenta clara redução da distensão do tecido conjuntivo provocado pelo

edema, mas aparentemente não há alteração na migração celular. ( figura 14 e fotomicrografia 1, 2, e 3).

Estes dados em conjunto indicam que o extrato apolar de *N.cataria* possui efeito antiinflamatório na mesma direção ao da dexametasona e, portanto, a continuidade dos estudos sobre os princípios ativos, e mecanismos de ação, desta fração da planta, são necessários para a possível descoberta de uma nova molécula útil nos processos antiinflamatórios.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN A.K., *Imunologia Celular e Molecular*, 4 **Edição**, Editora Revinter, Rio de Janeiro, 2003.

ABDEL-SALAM, O.M.E.; BAIUOMY, A.R.; EI-SHENAWY, S.M.; ARBID, M.S. The anti-inflammatory effects of phosphodiesterase inhibitor pentoxifyline in the rat. **Pharmacol. Res.**, v. 47, n.4, p. 331-340, 2003.

ABRAHAM, Z. *et al*, Screening of Indian plants for biological activity. **Part XII. Ind. J. Exp .Biol**, v. 24, p. 48-68, 1986.

ADAMS, D.O.; HAMILTON,T.A. The cell biology of macrophages activation. **Ann. Rev. Immunol.**, v. 2, p. 283-318, 1984.

ANDRADE, M.M.J.; MARCO, V. Antinflamatórios esteroidais. In: Spinosa et al, **Farmacologia Aplicada 'A Medicina Veterinária**, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2006, p. 273-288

ARRANG, J.M.; GARBARG, M.; SCHWARTZ, J.C. Auto-inhibition of brain histamine realease mediated by novel class (h3) of histamine receptor. **Nature**, v. 302, p. 832-837, 1983.

ASCHOFF, L. Das reticulo-endotheliale. **System. Ergeb. Inn. Med. Kinderheilkd**, v. 26, p. 1-118,1924

ASH, A.S.F.; SCHILD, H.O., Receptors mediating some actions of histamine. **Br. J. Pharmacol**, v. 27, p. 427-439, 1966.

AUGER, M.J.; ROSS, F. M.,MACKIE, M.J. 8;21 translocation with duplication of the der (21) in a patient with myelomonocytic leukemia. **Cancer Genet. Cytog.**, v. 51, n.1, p. 139-141,1991.

AYDIN, S. *et al*, Nepetalactone: A new opioid analgesic from *Nepeta caesarea Boiss.* **J. Pharm.Pharmacol.**, v. 50, p. 813-881, 1998.

BADWEY, J.A.; KARNOVSKY, M.L. Active oxygen species and functions of phagocytic leukocytes. **Annual Review of Biochemistry**, v. 49, p. 695-726, 1980.

BASSOE,C.F.; LAERUM,O.D.; HANEBERG,B.; SOLBERG,C.O. Phagocytosis of bacteria by human leucocytes measured by flow cytometry.**Proc.Soc.Exp.Biol.Med.**, v. 174, p. 182-186,1983a.

BASSOE,C.F.; LAERUM,O.D.; GLETTE,F.; HOPEN,G.; HANEBERG,B.; SOLBERG,C.O. Simultaneous measurement of phagocytosis and phagosomal pH by flow cytometry: role of polymorphonuclear neutrophilic leukocytes granules in phagosome acidification.**Cytometry**, v. 4, p. 254-262,1983b.

BEICHE, F.; SCEUERER, S.; BRUNE, K. *et al*. Up-regulation of cyclooxygenase-2 mRNA in the rat spinal cord following peripheral inflammation. **FEBS Lett** , v. 390, p. 165-169, 1996.

BENGTSSON, T.; JACONI, M. E. E.; GUSTAFSON, M.; MAGNUSSON, K. E.; THELER, J. M.; LEW, D. P.; STENDHAL, O. Actin dynamic in human neutrophils during adhesion and phagocytosis is controlled by changes in intracellular free calcium. **Eur. J. Cell. Biol.**, v. 62, p. 49-58, 1993.

BERNARDI, M.M. *et al*, Behavioral effects of catnip (*Nepeta cataria*) in mice. **Anais Congresso Panamericano de Ciências Veterinárias**, Acapulco, 16:121, 1994.

BLACK, J.W.; DUCAN, W.A.M.; DURANT, G.J.; GANELLIN, C.R.; PARSONS, M.E. Definition and antagonism of histamine H<sub>2</sub>-Receptors. **Nature**, v. 236, p. 385-390, 1972.

BONTA, I.L.; BULT, H. Effects of anti-inflammatory drugs on the carrageenan-induced hind paw inflammation of rats deprived of endogenous precursors of prostaglandins. **Agents Action Suppl.**, v. 2, p. 77-83, 1977.

BRANDLEY, P.B. *et al*, Proposals for the classification and nomenclature of functional receptors for 5-hydroxytryptamine. **Neuropharmacol.**, v. 25, p. 563-576, 1986.

BUCKLEY, T.L.; BRAIN, S.D. Function interaction between inflammatory mediators, in the microcirculation and relevance neurogenic components. In Brain, S.D.; *The handbook of immunopharmacology of microcirculation*. **San Diego, Academic Press.** , p. 63-76, 1994.

CHANDRASEKHARAN,N.V.; DAI H.; TUREPU Ross ,K.L., *et al.* COX-3 , a cyclooxygenase -1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression. **Proc.Natl. Acad. Sci. USA**, v. 99, p. 13926-13931, 2002.

CHURCH, M.K.; MILLER, P. Time courses of the anti-anaphylactic and anti-inflammatory effects of dexamethasone in the rat and mouse. **Br. J. Pharmacol.**, v. 62, n.4, p. 481-486, 1978.

COHN, Z.A. The structure and function of monocytes and macrophages. **Adv. Immunol., New York**, v. 9, p. 163-214, 1968.

COHN, Z.A. The activation of molecular phagocytes: fact fancy, future. **J.Immunol.** , v. 21, p. 813-816,1978.

COSTA ROSA L. F.; CURI, R.; MURPHY, C.; NEWSHOLME,P. Effect of adrenaand phorbol myristate acetate or bacterial lipopolysaccharide on stimulation of pathways of macrophages glucose, glutamine and O<sub>2</sub> metabolism. Evidence for cyclic AMP-dependent protein kinase mediated inhibition of glucose-6-phosphate dehydrogenase and activation of NADP<sup>+</sup> - dependent 'malic' enzyme. **Biochem. J.**, v. 1, n.310, p. 709-714, 1995.Pt2.

COTRAN,R.S.; KUMAR,V.; COLLINS,T. Pathologic Basis of Disease, **Published by W. B. Saunders Company, Ltd. , Philadelphia, Pennsylvania, 6<sup>th</sup> Edition**, p. 50-88, 1999.

CROSNSTEIN, B.N. *et al.* A mechanism for the inflammatory effects of corticosteroids: the glucocorticoids receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of endothelial leukocyte adhesion molecule 1 and intercellular adhesion molecule 1. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA**. v.89, p.9991-9995, 1992.

CUI, S.; REICHNER, J.S.; MATEO, R.B.; ALBINA, J.E. Activated murine macrophages induce apoptosis in tumor cells through nitric-oxide-dependent or independent mechanism. **Cancer Res.**, v. 54, p. 2462-2467, 1994.

DA SILVA, F.R.; Lazzarini, R.; DE SA-ROCHA, L.C.; MORGULLIS, M.S.; DE OLIVEIRA MASSOCO, C.; PALERMO-NETO, J. Effects of acute and long-term diazepam administrations on neutrophil activity: a flow cytometric study. **Eur J Pharmacol**, n.8, v. 478 (2-3), p. 97-104, Oct - 2003.

DA SILVA, F. R. Efeitos de Benzodiazepínicos. **Dissertação de mestrado em Farmacologia, Instituto de Ciências Biomédicas, ICB, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.**

DAVENPECK, K.L.; GAUTHIER, T.W.; ALBERTINE, K.H.; LEPER, A.M. Role of P-selectin in microvasculatur leukocytes-entothelial interation in splanchnic ischemia-reperfusion. **Am. J. Physiol.** , v. 267, p. H622-H630, 1994.

DI ROSA, M. Biological properties of carrageenan. **J. Pharmacy Pharmacol.**, v.24, p.82-102, 1971.

ELWOOD, W. *et al.*, Role of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase metabolites, platelet-activating factor and 5-hydroxytryptamine in allergen-induced airway response in the brown Norway rat. **Int. Arch. Allergy Immunol**, v. 103, p. 67-72, 1994.

FEARRON, D.T.; COLLINS, L.A. Increased expression of C3b receptor on polymorphonuclear leukocytes induced by chemotactic factors and purification procedures. **J.Immunol**. v.130, p. 370-375, 1983.

FERREIRA, S.H.; VANE, J.R. Mode of action of anti-inflammatory agents which are prostaglandin synthetase inhibition, in: *Anti-inflammatory Drugs*, Eds. **J. R. Vane and S. H. Ferreira** (springer-Verlag, Berlin), v. 50, n.II, p. 348, 1979.

FLOREY, H.W., *Inflammation* In: *General Pathology*, **4<sup>th</sup> Edition H.W. Florey, Ed. Philadelphia, Saunders**, p. 1-174, 1970.

FURCHGOTT, R.F.; ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 28, p. 373, 1980.

GALLIN J.I.; GOLDSTEIN, M.I.; SNYDERMAN, R. *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*, **2 th Edition Published by Raven Press, Ltd. ,New York**, p.1-4, 1992.

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

GARCIA LEME, J., Hormones and Inflammation. **CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida**, p. 238, 1989.

GIOVANNI, T.M.; HABR-ALENCAR, S.; BERNARDI, MM. Avaliação dos efeitos das folhas de *Nepeta cataria* (catnip) em comportamentos ligados à esfera reprodutiva. **II Simpósio de Pós-graduação e XV Simpósio de Iniciação científica do VPT-USP. Anais do II Simpósio de Pós-graduação e XV Simpósio de Iniciação científica do VPT-USP, 2006** (meio digital).

GORDON, N. Biology of macrophages. **J.Cell.Sci.** v. 4, p. 267-2865, 1986.

GRYGLEWISK, R.J.; PALMER,R.M.; MONCADA,S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. **Nature**, v. 320, p. 454-456, 1986.

HAMMOND, B.; KONTOS, H.A. ; HESS,M.L. Oxygen radicals in the adult respiratory distress syndrome, in myocardial ischemia and reperfusion injury, and in cerebral vascular damage. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 63, p. 173 -187, 1985.

HARADA, Y.; KAWAMURA, M. T.; HATANAKA, K.; SAITO, M.; OGINO, M.; OHNO, K.; YANG, Q. Differing profiles of prostaglandins formation inhibitors between selective prostaglandin H synthase-2 inhibitors and conventional NSAIDs in inflammatory and non-inflammatory sites of rats. **Prost, Others Lipid. Mediat.**, v.55, p.345-358, 1998.

HART, L.B. *et al*, Analysis of the catnip reaction: Mediation by olfactory system, not vomeronasal organ. **Behavioral and neural biology**; v. 44, p. 38-46, 1985.

HASUI, M.; HIRABAYASHI, Y.; KOBAYASHI, Y. Simultaneous measurement by flow cytometry of phagocytosis and hydrogen peroxide production of neutrophils in whole blood. **J. Immunol Methods**; v. 117, p. 53-58, 1989.

HATCH, C.R. *et al*, Effect of drugs on catnip (*nepeta cataria*)-Induced pleasure behavior in cat. **American Journal of Veterinary Research**; v. 33, p. 143-155, 1972.

HILL,S.J.; GANELLI,C.R.; TIMMERMAN,H.; SCHWARTZ,J.C.; SHANKLEY,N.P.; YOUNG,J.M.; SHUNACK,W.; LEVI,R.; HASS,H.L. International Union of Pharmacology.XIII. Classification of histamine receptors. **Pharmacol.Rev.**, v. 49, p. 253-278, 1997.

HILL,S.J. Distribution, properties and function characteristics of three classes of histamine receptor. **Pharmacol. Rev.** v. 42, p. 45-83, 1990.

HIGGS, G.A.; EAKINS, K.E.; MUGRIDGE, K.G.; MONCADA, S.; VANE, J.R. The effects of non-steroid anti-inflammatory drugs on leukocytes migration in carrageenan-induced inflammation. **Europ.J.of Pharmacol.**, v. 66, p. 81-86, 1980.

HIRABAYASHI, Y., TANIUCHI, S.; KOBAYASHI, Y. A quantitative assay of oxidative metabolism by neutrophils in whole blood using flow cytometry. **J.Immunol.Methods**, v. 82, p. 253-259, 1985.

HOPPER, K.E. Kinetics of macrophage recruitment and turnover in peritoneal inflammatory exudates induced by salmonella or thioglycollate broth. **J.Leuk.Biol.**, v. 39, p. 435-445, 1986.

IGNARRO, L.J. Nitric Oxide: A novel signal transduction mechanism for transcellular communication. **Hypertension**, v. 16, p. 477-483, 1990.

JACKSON, B. *et al*, Catnip and the alteration of consciousness. **Jama**, v. 207, p. 1349-1350, 1969.

JOHNSTON, R. B. Jr. Enhancement of phagocytosis-associated oxidase metabolism as a manifestation of macrophage activation. **Lymphokines**, v. 3, p. 33-56, 1978.

JOHNSON, A.R.; REYTYAK, G.; CAMPBELL, W.B. Arachidonic acid metabolites and endothelial injury: studies with cultures of human endothelial cells. **Fed. Proc.**, v. 44, p. 19-24, 1985.

JOHANNINSSON, A.; GRO-NDAHL, G.; DEMMERS, S.; JENSEN-WERN, M. Flow-cytometric studies on the phagocytic capacities of equine neutrophils. **Acta Vet. Scand.** , v 36, p. 553 – 562, 1995.

JORENS, P.G.; MATTHYS, K.E.; BULT, H. Modulation of nitric oxide syntase activity in macrophages. **Mediators of Inflammation**, v. 3, p. 33-56, 1995.

KANETA, S. *et al*, Mouse paw anaphylaxis. **J. Immunol. Meth.**, v. 71, p. 83-95, 1994.

KARNOVSKY, M.L.; LAZDINS, J.K. The biochemical criteria for activated macrophages. **J. Immunol.** , v. 121, p. 809-813, 1978.

KOHNO, S. *et al*, Possible participation of histamine H<sub>3</sub>-receptors in the regulation of anaphylactic histamine release from isolated rat peritoneal mast cell. **Jnp. J. Pharmacol**, v. 66, p. 173-180, 1994.

KRONCKE, K.D.; FEHSEL, K.; KOLB-BACHOFEN, V. Inductible nitric oxide synthase in human disease. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 113, p. 147-156, 1998.

KUBES, P.; GRANGER, D.N. Nitric Oxide modulates microvascular permeability. **Am. J. Physiol.**, v. 262, p. G575-G581, 1992.

KUBES, P.; SUZUKI, M.; GRANGER, D.N. Nitric Oxide and endogenous modulator of leukocytes adhesion. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, p. 4651-4655, 1991.

LAZZARINI, R.; MALUCELLI, B.E.; MUSCARA, M.N.; DE NUCCI G. and PALERMO-NETO, J. Reduction of inflammation in rats by diazepam: tolerance development. **Life Sci.**, v. 71, p. 2361-2368, 2003.

LAZZARINI, R.; MALUCELLI, B.E.; PALERMO-NETO, J. Reduction of acute inflammation in rats by diazepam: Role of peripheral benzodiazepine receptors and corticosterone. **Immunopharmacol. Immunotoxicol.**, v. 23, p. 253-265, 2001.

LAZZARINI, R.; PAULINO, C.A.; MALUCELLI, B.E.; PALERMO-NETO, J. Effects of high doses of diazepam on carrageenin-induced paw edema in rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 29, p. 1525-1529, 1996.

LEWIS, G.P.; WHITTLE, B.J. Actions of phospholipase-A on mast-cell histamine release and paw oedema in the rat [proceedings]. **Br. J. Pharmacol.**, v. 61, n.2, p. 229-235, 1977.

LEY, K.; AFFORS, K.E. Changes in macromolecular permeability by intravascular generation of oxygen-derived free radicals. **Microvasc. Res.**, v. 24, p. 25-33, 1982.

LICHTENSTEIN, L.M.; GILLESPIE, E. The effects of the H<sup>1</sup> and H<sup>2</sup> antihistamines on “allergic” histamine release and its inhibition by histamine. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 192, p. 41-450, 1975.

LORENS, P.G.; MATTHIYS, K.E; BULT, H. Modulation of nitric oxide synthase activity in macrofages. **Mediators of inflammation**, v. 3, p. 33-56, 1995.

MACKANESS, G.B. The monocyte in cellular immunity. **Semin. Hematol.**, v.7, n. 2 :172-184, 1970.

MAIRESSE, M., Health Secrets of Medicinal Herbs. **Arco Publishing, New York**, p. 28, 1981.

MAJNO, G.; JORIS, I. **Cells, Tissues, and Disease: principles of general pathology**, Published by Braun-Brumfield, Inc., USA, p. 365-383, 1996.

MASSOCO, C.O. *et al*, *Considerações gerais sobre o catnip (Nepeta cataria): uma planta com efeitos alucinógenos para gatos?* **REV.INST.Ciênc. Saúde**, v. 9, n.2, p. 85-87, 1991.

MASSOCO, C.O. *et al*, Possível envolvimento do sistema dopaminérgico central nos efeitos comportamentais do catnip (erva do gato) em camundongos. **Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**; p.12, 1992.

MASSOCO, C.O. *et al*, Behavioral effects of acute and long-term administration of catnip (*Nepeta cataria*) in mice. **Vet Human Toxicol**; v. 37, p. 530-533, 1995.

MASSOCO, C.O.; PALERMO-NETO, J.; SOUZA, W.R. Effects of physical and psychological stressors on behavior, macrophages activity, and Ehrlich tumor growth. **Brain Behav Immun.** , v. 17, n. 1, p. 43-54, 2003.

MATHEWS K.L. Nonsteroidal anti-inflammatory analgesic. **Vet Clin. N.Am (Sm Anim Pract)**, v. 30, p. 783-804, 2000.

MCINTYRE, T. M.; ZIMMERMAN, G. A.; SATOH, K.; PRESCOTT, S. M. Cultured endothelial cells synthesize both platelet-activating factor and prostacyclin in response to histamine, bradykinin and adenosine triphosphate. **J. Clin. Invest.**, v. 76, p. 271-280, 1985.

MEDEIROS, M. V.; BINHARA. I. M.; MORENO JR, H.; ZATZ, R.; De NUCCI, G.; ANTUNES, E. Effect of chronic nitric oxide synthesis inhibition on the inflammatory responses induced by carrageenin in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 285, p. 109-114, 1995.

MELLO, S.B.V.; LAURINDO, I.M.M. A Resposta Inflamatória, In: Yoshinari, Bonfa. **Reumatologia para o Clínico, São Paulo, Editora Roca**, 2000.

MELMON; K. L.; ROCKLIN, R. E.; ROSENKRANZ, R. P. Autacoids as modulators of the inflammatory and immune response. **Am. J. Med.**, v. 71, p. 100-106, 1981.

METCHNIKOFF, E., 1905. **APUD AUGER & ROSS**, 1992.

MICELLI, N. *et al.*, Anti-inflammatory activity of extract and fractions from *Nepeta sibthorpii* Bentham. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 261-266, 2005.

MILLER, F. N.; SIMS, D. E. Contractile elements in the regulation of macromolecular permeability. **Fed. Proc.**, v. 45, p. 84-88, 1986.

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

MONCADA, S.; VANE, J. R. Arachidonic acid metabolites and the interactions between platelets and blood-vessel walls. **The New England Medicine**, v. 300, p. 1142-7, 1979.

MONCADA, S.; FERREIRA, S. H.; VANE, J. R. Prostaglandins, aspirin-like drugs and the edema of inflammation. **Nature**, v. 246, p. 217-9, 1973.

NATHAN, C.F.; ROOT, R.K. Hydrogen peroxide release from mouse peritoneal macrophages. Dependence on sequential activation and triggering. **J. Exp. Med.**, v. 146, p. 1648-1652, 1977.

NATHAN, C.F. Secretory products of macrophages. **J. Clin. Invest.** V. 79, p. 319-326, 1987.

NAVA, E.; PALMER, R. M. MONCADA, S. Inhibition of nitric oxide synthesis in septic shock: much is beneficial. **Lancet**, v. 338, p. 1555-1557, 1991.

NORTH, R.J. The concept of activated macrophage. **J.Immunol.**, v. 121, p. 806-809, 1978.

OSTERHOUDT, K.C. *et al.*, Catnip and alteration of human consciousness. **Vet Human Toxicol.** , v. 39, n.6, p. 373-375, 1997.

PALEN, F.G. *et al.*, Catnip and oestrus behaviors in the cat. **Animal Behaviour** , v. 14, p. 372-377, 1966.

PEACH, M. J.; LOEB, A. L.; SINGER, H. A.; SAYE, J. Endothelium-derived vascular relaxing factor. **Hypertension**, v.7, p. 194-1100, 1985.

PICK, E.; MIZEL, M. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide produce by cell in culture. **J. Immunol. Meth.** , v. 38, p. 161-170, 1980.

PROUD, D.; KAPLAN, A. P. Kinin formation mechanisms and role in inflammatory disorders. **Ann. Rev. Immunol.**, v. 6, p. 49-83, 1988.

QU, X. F.; YAMAKI, K.; OH-ISHI, S. Vascular permeability increase in the mouse paw during the passive anaphylaxis reaction. **Jpn. J. Pharmacol.**, v. 57, p 255-257, 1991.

RAIDAL,S.L.; BAILEY,G.D.; LOVE,D.N. Flow cytometric determination of oxidative burst activity of equine peripheral blood and bronchoalveolar lavage-derived leukocytes. **Vet.J.**, v. 156, p. 117-126,1998.

RADOMSKI, M. W.; PALMER, R. M. J.; MONCADA, S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. **Lancet**, v. 2, p. 1057-1058, 1987.

RADOMSKI, M. W.; PALMER, R. M. J.; MONCADA, S. Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not constitutive nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. **Proceed. Nat. Acad. Sci. USA**, v. 87, p. 10043-10049, 1990.

RAIBLE, D. G.; SCHULMAN, E.S.; DIMUZIO, J.; CARDILLO, R.; POST, T. J. Mast cell mediators prostaglandin-D2 and histamine activate human eosinophils. **J. Immunol.**, v. 148, p. 3526-3542, 1992.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. **Pharmacology**, 5 th ed, Rio de Janeiro; Elsevier, 2004.

RAPPOLEE, D.A.; WERB, Z. mRNA phenotyping for studying gene expression in small numbers of cells: platelet-derived growth factor and other growth factor in wound-derived macrophages. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v.2, n.1, p. 3-10, 1990.

REGOLI, D.; BARBARÉ, J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. **Pharmacol. Rev.**, v. 32, p. 1-46, 1980.

REGNIER, F.E.; WALLER, G.R.; EISENBRAUN, E.J.; AUDA, H. The biosynthesis of methylcyclopentane monoterpenoids-II. **Phytochemistry**, v. 7, p. 221-230, 1968.

RICCI, E.L. Avaliação dos possíveis efeitos antinociceptivos do óleo essencial de *Nepeta cataria* (catnip) em camundongos. **Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas**, Universidade Presbiteriana Mackenzie, 2006.

ROBBINS, S.L.; COTRAN, R.S.; KUMAR, V. **Patologia Estrutural e Funcional**. Editora Guanabara Koogan S.A, Rio de Janeiro, 7<sup>a</sup> ed., 2005.

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

ROHN, T. T.; NELSON, L. K.; SIPES, K. M.; SWAIN, S. D.; JUTILA, K. L.; QUINN, M. T. Priming of human neutrophils by peroxynitrite: potential role in enhancement of the local inflammatory response. **J. Leukoc. Biol.**, v. 65, p. 59-70, 1999.

ROOT, R. K.; METCALF, J.; OSHINO, N.; CHANCE, B. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release from human granulocytes during phagocytosis. **J. Clin. Invest.**, v. 55, p. 945, 1975.

ROTHER, G.; VALET, G. Flow cytometry analysis of respiratory *burst* activity in phagocytes, with hydroethidine and 2' 7' – dichlorofluorescein. **J. Leuk. Biol.**, v. 47, p. 440 – 448, 1990.

RUBANY, G. M.; VANHOUTTE, P. M. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. **Am. J. Physiol.**, v. 250, p. H815-H821, 1986.

SAAD, A. M.; HAGELTORN, M. Flow cytometric characterization of bovine blood neutrophil Phagocytosis of fluorescent bacteria and zymosan particles. **Acta Vet. Scand.**, v. 26, p. 289-307, 1985.

SCHAYER, R. W. Histidine decarboxylase in man. **Ann. of New York Acad.**, v. 103, p. 164-9, 1963.

SEDGWICK, A. D.; EDWARDS, J. C. W. Increased inflammatory reactivity in newly formed lining tissue. **J. Pathol.**, v. 141 p. 283-95, 1985.

SENDER, L.; MASSOCO, C.O.; SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. Efeitos da administração aguda e prolongada do catnip (*Nepeta cataria*) a camundongos em modelos comportamentais de depressão e ansiedade. **Revista do Instituto de Ciências da Saúde, São Paulo (UNIP)**, v.16, n.1, p.7-11, 1998.

SHERRY, C.J. *et al.*, The effects of an ethanol extract of catnip (*Nepeta cataria*) on behavior of young chick. **Experientia**, v. 35, p. 237-238, 1978.

SILVA, P. **Farmacologia, 7ªEd.**, Rio de Janeiro, Editora Guanabara, 2005.

SORIANELLO, E.; SCHILLACI, R.; CHAMSON-REIG, A; LUXLANTOS, V.; LIBERTUN, C. Actions of Immunosuppressor Drugs the Development of an Experimental Ovarian Tumor. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 227(8), p. 658-664, 2002.

SMITHERMAN, L.C. *et al.*, The use folk remedies among children in an urban black community: remedies for fever, colic, and teething. **Pediatrics**, v.115, p. 297-304, 2005.

STANKEVICIUS, D. Ansiedade induzida pela picrotoxina: reflexos comportamentais, bioquímico e sobre a atividade de macrófagos peritoneais. Dissertação de mestrado em Farmacologia, Instituto de Ciências Biomédicas, ICB, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

STERANKA, L. R.; FARMER, S. G.; BURCH, R. M. Antagonists of B<sub>2</sub> bradykinin receptors. **FASEB Journal**, v. 3, p. 2019-25, 1989.

TASAKA, A.C. Antinflamatórios esteroidais. In: Spinosa et al, **Farmacologia Aplicada 'A Medicina Veterinária**, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2006, p. 256-272.

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

VAN FURTH, R.; COHN, Z.A.; HIRSCH, J.G.; SPECFTOR, W.G.; LANGEVOORT, H.L. The mononuclear phagocytes system a new classification of macrophages, monocytes and their precursor cells. **Bull. Who**, v. 46, p. 845-852, 1972.

VAN ROOIJEN,N.; SANDRES,A.;JONES – CARSON,J;BALISH,E. Candidacidal activity of macrophages from immnocompetent and congenitally immunodeficiente mice. **J. of Infect. Disea.**, v.70, p. 180-188,1992.

VANE, J.R. A. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nature**, p. 231-232, 1971.

WERB,Z.; BANDA,M.J.; JONES,P.A. Degradation of connective tissue matrices by macrophages.I Proteolysis of elastin, glycoproteins, and collagen by proteinases isolated from macrophages culture.**J.Exp.Med.**,v. 152, p. 1340-1357,1980.

WERB,Z.; CHIN, J.R. Apoprotein E is synthesized and secreted by resident and thioglycolate-elicited macrophages but not by pyran copolymer or bacillus Calmette Guerin- activated macrophages. **J. Exp. Med.**, v.43, p. 1240-1253, 1981.

WERB, Z.; HEMBRY, R.M.; MURPHY, G.; AGGELER, J. Commitment to expression of metalloendopeptidases, collagenases and stromelysin: relationship of inducing events to changes in cytoskeletal architecture. **J. Cell. Biol.**, v.102, p. 697-702, 1986.

WILLIAMS, K. L.; HIGGS, G. A. Eicosanoids and inflammation. **J. Pathol.**, v. 156, p. 101-10, 1988.

WILLIAMS, T. J.; MORLEY, J. Prostaglandins as potentiators of increased vascular permeability in inflammation. **Nature**, v.246, p. 215-7, 1973.

WILLOUGHBY, D. A. Effects of prostaglandins PGF<sub>2</sub> $\alpha$  and PGE<sub>1</sub> on vascular permeability. **J. Pathol. and Bacter.**, v. 96, p. 318-7, 1968.

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

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)