



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA

NORMA VILANY QUEIROZ CARNEIRO

**AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE
ANTIINFLAMATÓRIA DA *SAMBUCUS AUSTRALIS*
CHAM. & SCHLTDL, *IN VITRO*.**

Salvador, BA
2015

NORMA VILANY QUEIROZ CARNEIRO

**AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE
ANTIINFLAMATÓRIA DA *SAMBUCUS AUSTRALIS*
CHAM. & SCHLTDL, *IN VITRO*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Imunologia, da Universidade Federal da Bahia como
requisito parcial para obtenção do título de Mestre em
Imunologia.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Camila Alexandrina Figueiredo
Co-orientador: Prof^o. Dr^o. Ryan dos Santos Costa

Salvador, BA
2015

AGRADECIMENTOS

A Deus pela sabedoria e amor, e por fortalecer minha fé sempre para continuar.

A minha Mãe, Normaleide, pelo exemplo e inspiração por ser uma grande educadora, o que me move a viver cada etapa; pela sua coragem e incentivos! E a minha irmã, Wileyde, pelo respeito, por desligar a TV quando precisei de silêncio e pelas diversas conversas filosóficas revitalizadoras. Irmã, obrigada pela tolerância e por acreditar sempre em mim! Amo vocês!

A Prof^a Dr^a Camila Alexandrina Viana de Figueiredo, minha orientadora, pela confiança desde a graduação, pelas oportunidades e incentivos a todo momento; por acreditar no meu trabalho, permitindo perspectivas; pela amizade, os cuidados e carinho. Uma grande satisfação trabalharmos juntas!

A Prof^a Dr^a Neuza Maria Alcantara Neves, por permitir o acesso ao LAA, e pelas oportunidades. Obrigada pela confiança e ensinamentos!

Ao Prof^o Dr^o Ryan dos Santos Costa, meu co-orientador, pela confiança ainda como sua IC, pelos desafios e ensinamentos; pelas reclamações, e por responder todos meus infinitos e-mails (rsrs.) Obrigada pela parceria durante todo o trabalho, pela forte amizade e paciência. Tenho hoje é um grande amigo!

A Prof^a Dr^a Marta Santos Machado, pela parceria na minha estréia como IC, pela confiança, disponibilidade em ajudar sempre, pela nossa amizade e por ser essa pessoa tão calma. Aprendemos muito juntas! Você é um anjo!

Ao Prof^o Dr^o Eudes Velozo, por abrir as portas do LAPEMM e viabilizar a obtenção dos extratos deste trabalho. Obrigada pela confiança!

A Prof^a Dr^a Adilva Conceição, por contribuir na identificação da planta estudada.

A Prof^a Dr^a Tânia Maria Sarmento da Silva e sua equipe pela colaboração.

A todos os amigos do IMUNOBIO e LAA pela colaboração e amizade. Somos uma família!

A Hugo Bernardino e Raimon Rios, pela fiel parceria durante cada experimento, pelas risadas e pizzas compartilhadas quando precisamos ficar até mais tarde no LAB, pela troca de idéias nas madrugadas e pelas conversas descontraídas; por serem tão companheiros e amigos. Vocês são “peças” essenciais neste trabalho. Amo vocês!

A Tamires Cana Brasil e Cintia Marques pelo tempo dedicado para conclusão deste trabalho e pelos momentos descontraídos. Obrigada pela amizade!

A Família Carneiro e a Família Queiroz, meus amores, por respeitarem minha ausência, e estarem sempre na torcida! Obrigada por tanto amor!

Aos meus amigos Ricardo e Vinícius, pela disponibilidade em me buscarem altas horas da noite e madrugadas no Lab, quando precisei concluir alguns experimentos. Obrigada pela preocupação e carinho!

Ao amigo Anaque pela prestatividade e companhia agradável. Valeu jovem!

Ao amigo Severiano Filho, pela força e carinho, mesmo longe! Obrigada amigo!

A equipe da CPqGM-Fiocruz, pelo acesso e confiança!

Aos funcionários do PPGIm, Dilcéia, Sônia e Giovanni, por nos ajudarem com as questões acadêmicas e sempre de bom humor. Parabéns pela dedicação!

Ao PPGIm, coordenado pela Prof^a. Dr^a Silvia Lima Costa, pela boa energia, apoio e incentivo à realização deste trabalho.

Aos amigos por compreenderem minhas limitações por alguns dias e a todos que contribuíram de alguma forma para conclusão deste trabalho, além de torná-lo uma fonte futura para busca de novas drogas antiinflamatórias.

Eu, enquanto homem, não existo somente como criatura individual, mas me descubro membro de uma grande comunidade humana. Ela me dirige, corpo e alma, desde o nascimento até a morte. Meu valor consiste em reconhece-lo. Sou realmente um homem quando meus sentimentos, pensamentos e atos tem uma única finalidade: a comunidade e seu progresso.

Albert Einstein

RESUMO

A inflamação é um processo de defesa do organismo que ocorre, geralmente, quando é agredido por algum patógenos ou fatores externos com sintomas característicos de dor, rubor e tumor e perda da função que ocorre quando o processo se cronifica. Para o tratamento das diferentes condições inflamatórias tem sido muito utilizado, como alternativa, as plantas medicinais devido, especialmente, aos importantes efeitos colaterais e acesso restrito das diversas drogas comercialmente disponíveis, como os Glicocorticoides (GCs) e os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs). Nesse contexto, a *Sambucus australis* Cham. & Schiltl (Sa) é uma das plantas mais utilizadas pela população para tratar enfermidades inflamatórias, conforme mostrado em estudo recente, realizado em São Francisco do Conde, por nosso grupo, entretanto, há poucas evidências científicas que fundamentem o uso desta espécie. Neste sentido, o presente estudo teve como objetivo avaliar a potencial atividade antiinflamatória da *Sambucus australis* Cham. & Schiltl, *in vitro*. Para isto, em cultura de esplenócitos estimuladas com PWM foram avaliados os níveis de citocinas (ELISA) pró- inflamatórias, como IL-4, IL-5, IFN-γ e a citocina regulatória IL-10, e a expressão do fator de transcrição NF-κB (RT-PCR). Além disso, realizamos ensaio de estabilização de membrana e dosamos óxido nítrico em culturas de macrófagos. O tratamento com extrato metanólico da Sa (EMSa) nas concentrações de 100, 50, 25 e 12,5 µg/mL diminuíram os níveis de IL-4 ($p<0,001$), IL-5 ($p<0,001$) significativamente, e apenas a concentração de 100 µg/mL foi capaz de reduzir os níveis de IFN-γ ($p<0,001$). Entretanto, a concentração de 100 µg/mL também foi capaz de aumentar os níveis de IL-10, e reduzir a expressão do NF-κB ($p<0,01$). Em cultura de macrófagos estimuladas com LPS, o tratamento com o EMSa nas diferentes concentrações (100, 50, 25 e 12,5 µg/mL) diminui os níveis de óxido nítrico. Além disso, essas concentrações do EMSa teve um efeito protetor em ensaio de estabilização de membrana de eritrócitos. Estes resultados sugerem que a *Sambucus australis* Cham. & Schiltl tem um potencial efeito antiinflamatório, *in vitro*, caracterizado pela redução das citocinas inflamatórias e da expressão do NF-κB, e aumento de IL-10.

PALAVRAS-CHAVE: inflamação, *Sambucus australis*, Sabugueiro, antiinflamatória.

ABSTRACT

Inflammation is process for body's defense that usually occurs when it is affected by some pathogens or external factors presenting characteristic symptoms such as pain, redness, tumor and loss of function that occurs when the process gets chronic. As alternative for the treatment of inflammatory conditions, the medicinal plants have been used for a long time as medicines especially due to the classical side effects and restricted access of various commercially available drugs such as esteroids (GCs) and nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDss). In this context, *Sambucus australis* (Sa) was one of most cited herb to treat inflammatory diseases in a recent study conducted in San Franscisco do Conde, by our group, however, little is known in scientific literature that support the use of this species. In this way, the present study aimed to evaluate the potential antiinflammatory activity of *Sambucus australis*, *in vitro*. We performed spleen cells culture stimulated with PWM in order to evaluate the production of proinflammatory cytokines (ELISA) such as IL-4, IL-5, IFN- γ , and the regulatory cytokine IL-10 and expression of the transcription factor NF- κ B (RT-PCR). In addition, we evaluated the levels of nitric oxide in macrophages cultures and the membrane stabilizing activity of *S. australis* methanolic extract (EMSa). The treatment with EMSa at the concentrations of 100, 50, 25 and 12.5 ug/ml decreased IL-4 ($p<0.001$) and IL-5 ($p<0.001$) levels, significantly, and only at 100 ug /ml was able to reduce IFN- γ ($p<0.001$) levels. Moreover, at 100mg/mL EMSa was also able to increase IL-10 production and reduce NF- κ B expression ($p<0.01$). In macrophages cultures stimulated with LPS, EMSa was able to reduce nitric oxide levels ($p<0.001$) in all concentrations tested (100, 50, 25 and 12.5 ug / mL). Additionally, EMSa had a protective effect on erythrocyte membrane stabilization assay. Taken together, these results suggest that *Sambucus australis* has a potential anti-inflammatory effect *in vitro*, characterized by the reduction of inflammatory cytokines and the expression of NF- κ B and IL-10 up-regulation.

KEYWORDS: inflammation, *Sambucus australis*, Elderberry, antiinflammatory.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas do processo de obtenção dos extratos metanólicos e hexânicos das folhas da <i>Sambucus australis</i> Cham & Schltdl.....	35
Figura 2. Extratos metanólico e hexânico à quente das folhas da <i>Sambucus australis</i> Cham & Schltdl.....	41
Figura 3. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD do padrão àcido ursólico e nos extratos metanólico e hexânico das folhas da <i>Sambucus australis</i> Cham & Schltdl.....	42
Figura 4. Representação gráfica do efeito citotóxico do extrato metanólico das folhas da <i>Sambucus australis</i> Cham & Schltdl.....	43
Figura 5. Representação gráfica do efeito do extrato metanólico das folhas da <i>Sambucus australis</i> Cham & Schltdl na proliferação celular estimulada com PWM.....	44
Figura 6. Representações gráficas dos efeitos do extrato metanólico das folhas da <i>Sambucus australis</i> Cham & Schltdl sobre os níveis de IL-4, IL-5 e IFN-γ.....	45
Figura 7. Representação gráfica dos efeitos do extrato metanólico das folhas da <i>Sambucus australis</i> Cham & Schltdl sobre os níveis de IL-10.....	46
Figura 8. Representação gráfica do efeito do extrato metanólico das folhas da <i>Sambucus australis</i> Cham & Schltdl na estabilização de membranas.....	47
Figura 9. Representação gráfica dos efeitos do extrato metanólico das folhas da <i>Sambucus australis</i> Cham & Schltdl sobre a produção de óxido nítrico.....	48
Figura 10. Representação gráfica do efeito do extrato metanólico das folhas da <i>Sambucus australis</i> Cham & Schltdl sobre a expressão do fator de transcrição NF-κB.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Parâmetros e sequências de bases utilizadas na detecção de NF-κB e β-actina.....	40
Tabela 2 Quantificação de ácido ursólico nos extratos metanólico e hexânico das folhas da <i>Sambucus australis</i> Cham. & Schltl	43

ABREVIATURAS

PMN: Polimorfonucleares

ROS: Espécies reativas de oxigênio

NO: Óxido nítrico

NF-κB: Fator nuclear kappa B

Sa: *Sambucus australis* Cham. & Schltdl

PAF: Fator ativador de plaquetas

COX-2: Ciclooxygenase-2 induativa

iNOS: Óxido nitríco sintase

AA: Ácido araquidônico

PGE2: Prostaglandinas

FOA2: Fosfolipase 2

LOX: Lipoxigenase

Células NK: células *Natural Killer*

CMH: Histocompatibilidade

TLR: Toll Like

AP-1: Proteína de ativação

IFN-γ: Interferon-gama

IL- 10: Interleucina 10

APC: Células apresentadoras de antígeno

TNF-α: Fator de necrose tumoral alfa

VCAM-1: Molécula de adesão a célula vascular-1

DIIMs: Doenças inflamatórias imunomediadas

GCs: Glicorticóides

AINEs: Antiinflamatórios não-esteroidais

AAS: Ácido acetil salicílico

INDO: Indometacina

OMS: Organização Mundial da Saúde

SAM: *Sambucus*

DCV: Doença cardiovascular

AAPH: Radical 2,2 Azobis amidinopropano

DPPH: Radical 2,2- difenil-1-picrilhidrazil

EHSa: Extrato hexânico das folhas de *Sambucus australis* Cham. & Schltdl.

EMSa: Extrato metanólico das folhas de *Sambucus australis* Cham. & Schltdl.

LOD: Limite de detecção

LOQ: Limite de quantificação

LPS: Lipopolissacarídeo

PWM: Pokeweed

RT-PCR: Transcrição Reversa da Reação em cadeia de polimerase

ELISA: Ensaio imunoenzimático

ANOVA: Análise de variância

Treg: Células T regulatórias