



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA

WASHINGTON SANTOS ANTUNES

Avaliação da atividade imunomoduladora do extrato etanólico de *Physalis angulata* em cultura de linhagem PC12

Salvador, BA

2022

WASHINGTON SANTOS ANTUNES

**Avaliação da atividade imunomoduladora do extrato
etanólico de *Physalis angulata* em cultura de linhagem
PC12**

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

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Moraes Pinheiro

Coorientadora: Prof^a Dr^a Silvia Lima Costa

Salvador, BA

2022

Dedico esse trabalho aos meus pais que me deram a vida e apoio nas minhas escolhas, aos meus familiares e amigos que me ajudaram de forma direta ou indireta a vencer os desafios dessa etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À toda minha família, principalmente a minha mãe, Helena, e meu pai, Cícero, por todo o amor, força e incentivo. Permitindo que eu pudesse seguir com meus sonhos e me acolhendo nos momentos mais difíceis.

Ao meu grande amor e amiga, Mylena Dias, por todo o apoio, carinho e paciência. Obrigado às diversas vezes que me ouviu em meus momentos de estresse, medo e inseguranças.

Ao meu orientador, Prof^o Dr^o Alexandre Pinheiro, a quem sou extremamente grato por todo acolhimento, comprometimento, respeito, conhecimento, orientação e paciência para me ajudar a entender os caminhos da ciência durante essa etapa da minha vida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e o Programa de Pós-Graduação em Imunologia (PPGIIm) da Universidade Federal da Bahia (UFBA), por terem proporcionado e viabilizado essa oportunidade de ensino.

À corpo docente que tive contato e que constitui o Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular (LabNq), Prof^o Dr^o Victor Diogenes, Prof^a Dr^a Silvia Lima, Prof^a Dr^a Maria de Fátima, Prof^a Dr^a Ravena Nascimento, por todo o conhecimento, acolhimento e auxílio no dia a dia das atividades laboratoriais.

Aos demais alunos de pós-graduação que estavam no LabNq: Érica Novaes, Lucas Oliveira, Deivison Argolo, Ana Elisa, Balbino Santos, Cleonice Santos, Rodrigo Carreira, Lúcia Fonseca, Gabriel Ferrolho, Jéssica Teles, Jéssica Amparo, Itamara Raquel, Flávia Sanches e Catarina Nunes, por todas as trocas de ideias, acolhimento, ensinamentos e momentos de alívio.

À mestrande Janaína Ribeiro, minha “Coori”, à técnica Verônica Sousa e à Brenda Souza, por todas as dicas, ensinamentos, acolhimento, paciência, amizade, momentos de descontração e puxões de orelha. Serei eternamente grato!

Aos integrantes do Laboratório de Imunologia (LabImuno), Natália Lopes, Caio Lopes e Ramon Santos, por toda a amizade e auxílio durante essa etapa da minha

vida, pela ajuda para que eu pudesse iniciar o mestrado e seguir em frente. Vocês possuem um lugarzinho especial no meu coração.

Aos meus amigos da medicina veterinária, Davi Rocha, Anderson Santos e Yânca Souza, por todo o incentivo, momentos de descontração, companheirismo e carinho.

E a todos que direta e indiretamente contribuíram de alguma forma para a realização do presente trabalho.

A todos, muito obrigado!

“Viver é enfrentar um problema atrás do outro. O modo como você o encara é que faz a diferença”

(Benjamin Franklin)

RESUMO

Physalis angulata é uma planta que pode ser encontrada em regiões tropicais e subtropicais, onde é utilizada na medicina popular para o tratamento de inúmeras enfermidades. Diversos estudos utilizando diferentes componentes da *P. angulata* comprovaram ação antiinflamatória, antiparasitária, antioxidante e protetora. Diante disso, o presente trabalho buscou avaliar os efeitos do extrato etanólico bruto de *P. angulata* (EEPA) em culturas de células da linhagem PC12. O EEPA foi produzido a partir dos caules de *P. angulata*. A citotoxicidade de diferentes concentrações do EEPA foi determinada através do ensaio MTT. Para avaliar a morfologia celular e proliferação celular foi utilizado o corante Rosenfeld. O software *ImageJ v.1.53e* foi utilizado para realizar a contagem das células. Para verificar a resposta imunológica foram analisados os níveis de óxido nítrico, determinados pela mensuração do nitrito pelo método de Griess. Os resultados foram analisados pelo programa estatístico GraphPadPrism 7.0 e os dados foram expressos em média \pm desvio padrão da média dos parâmetros avaliados. O tratamento com EEPA nas concentrações 0,5; 1; 5 $\mu\text{g/mL}$ sugerem que não houveram citotoxicidade ou redução do número de células PC12. O extrato provocou alterações morfológicas nas células em todas as concentrações. A produção de NO foi reduzida em todas as concentrações, principalmente na concentração 0,5 $\mu\text{g/mL}$. Os dados obtidos no nosso trabalho sugerem que o EEPA pode modular negativamente a produção de NO e alterar a morfologia de células PC12, promovendo o aparecimento de prolongamentos sugestivos de neuritos.

Palavras-chave: Sistema Nervoso Central. Fitoterápico. PC12.

ABSTRACT

Physalis angulata is a plant that can be found in tropical and subtropical regions, where it is used in folk medicine for the treatment of numerous diseases. Several studies using different components of *P. angulata* proved anti-inflammatory, antiparasitic, antioxidant and protective action. Therefore, the present work sought to evaluate the effects of the crude ethanolic extract of *P. angulata* (EEPA) in cell cultures of the PC12 lineage. EEPA was produced from the stems of *P. angulata*. The cytotoxicity of different concentrations of EEPA was determined using the MTT assay. To evaluate cell morphology and cell proliferation, Rosenfeld dye was used. ImageJ v.1.53e software was used to count the cells. To verify the immune response, nitric oxide levels were analyzed, determined by measuring nitrite using the Griess method. The results were analyzed by the statistical program GraphPadPrism 7.0 and the data were expressed as mean \pm standard deviation of the mean of the evaluated parameters. Treatment with EEPA at concentrations 0.5; 1; 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ suggest that there was no cytotoxicity or reduction in the number of PC12 cells. The extract caused morphological changes in cells at all concentrations. NO production was reduced at all concentrations, mainly at 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The data obtained in our work suggest that EEPA can negatively modulate NO production and change the morphology of PC12 cells, promoting the appearance of processes suggestive of neurites.

Keywords: Central Nervous System. herbal medicine. PC12.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Crescimento de neuritos em células PC12.....	19
Figura 2: Aspectos morfológicos de <i>Physalis angulata</i>	22
Figura 3: Estruturas moleculares das fisalinas A, B, C, D e E.....	23
Figura 4: Análise do efeito do EEPA em células PC12.....	33
Figura 5: Avaliação do efeito do EEPA em células PC12.....	33
Figura 6: Dosagem de NaNO ₂ em células em células PC12.....	34
Figura 7: Coloração Rosenfeld para análise da morfologia e quantificação	35
Figura 8: Análise da citotoxicidade do EEPA em células PC12.....	36
Figura 9 : Contagem dos prolongamentos celulares.....	36

LISTA DE ABREVIÇÃO

- BHE** – Barreira Hematoencefálica
- BSA** – Albumina Sérica Bovina
- CD** – Cluster of differentiation (grupamento de diferenciação)
- DAMP** – Padrões Moleculares Associados a Danos
- DMEM** – Meio de Eagle Modificado por Dulbecco
- DMSO** – Dimetilsulfóxido
- DNA** – Ácido Desoxirribonucleico
- D.O** – Densidade óptica
- EEPA** – Extrato etanólico bruto de *Physalis angulata*
- HCL** – Ácido Clorídrico
- IFN γ** – Interferon gama
- IL** – Interleucina
- iNOS** – Óxido Nítrico Sintase Induzível
- LPS** – Lipopolissacarídeo
- MTT** – 3-(4-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolio
- NaNO₂** – Nitrito de sódio
- NLR** – Receptor Semelhante a NOD
- NO** – Óxido Nítrico
- NOD** – Domínio de Oligomerização Nucleotidea
- PAMP** – Padrão Molecular Associado à Patógeno
- PBS** – Tampão fosfato salino
- PFA** – Paraformaldeído
- RNA_m** – Ácido Ribonucleico Mensageiro
- SCAMP2** – Secretory Carrier Membrane Protein 2

SNARE – Receptores para fator solúvel sensível a N-etilmaleimida de membrana

SNC – Sistema Nervoso Central

Th1 – Resposta imune de células T auxiliares do tipo 1

Th2 – Resposta imune de células T auxiliares do tipo 2

TGF- β – Fator Transformador de Crescimento β

TLR – Receptor Semelhante à Toll

TNF – Fator de Necrose Tumoral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1. Sistema nervoso central e o sistema imune.....	14
2.2. Neurônios e Linhagens celulares PC12	17
2.3 Plantas medicinais, aspectos históricos e <i>Physalis angulata</i>	20
3 OBJETIVOS	26
3.1 OBJETIVO GERAL	26
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
4 CAPÍTULO 1: Artigo Científico:	27
4.1 Introdução.....	27
4.2 Materiais e métodos.....	29
4.3 Resultados.....	32
4.3.1 Screening de Citotoxicidade do EEPA em Linhagem PC12	32
4.3.2 Níveis de NO das células PC12 tratadas com EEPA.....	34
4.3.3 Contagem de células PC12 tratadas com EEPA - Coloração Rosenfeld.....	35
4.4 Discussão	37
4.5 Referência.....	41
5 CONCLUSÃO GERAL	46
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

1 INTRODUÇÃO

O Sistema Nervoso pode ser separado anatomicamente em duas partes, Sistema Nervoso Central (SNC), formado pela medula espinhal e encéfalo, e Sistema Nervoso Periférico (SNP), constituído por gânglios e nervos. Diferentes tipos celulares estão presentes no tecido nervoso, como os neurônios, macroglia (astrócitos, oligodendrócitos e células ependimárias) e microglia (MACHADO, 1998; KANDEL et al., 2000). Por muito tempo se acreditava que as células gliais fossem passivas. Entretanto, já se sabe que as células gliais e neuronais possuem plasticidade morfológica e funcional, sendo capazes de influenciar uma à outra (HAYDON, 2000).

O desenvolvimento da biotécnica de cultivo de tecidos já existe há quase um século, sendo de extrema importância para a elaboração de experimentos e outros procedimentos, auxiliando até mesmo no esclarecimento de como ocorrem algumas das interações célula-célula (AMARAL & SANTELLI, 2011).

As linhagens de células imortais PC12 tumoral (feocromocitoma murino) são utilizadas em diferentes tipos de estudos em virtude do caráter ético, simplicidade, custo, conhecimento e compreensão das funções se revelam como ótimas candidatas para criar um microambiente semelhante às células do sistema nervoso. Estudos envolvendo a exposição das células PC12 a diferentes moléculas com efeitos farmacológicos, são realizados para compreender os possíveis efeitos que tais moléculas poderiam gerar em células neuronais ou tumorais (GREENE & TISCHLER, 1976; STANSLEY et al., 2012; BARBOSA et al., 2015).

Após a descoberta de métodos químicos e analíticos capazes de extrair princípios de plantas com diferentes ações farmacológicas, diversos pesquisadores se dedicaram a obtenção de moléculas naturais com atividades biológicas, afim de obter produtos seguros e eficazes para o tratamento e prevenção de doenças (YUNES; CECHINEL FILHO, 2001; SCHULZ et al, 2002).

Physalis angulata é uma planta de hábito herbáceo, conhecida popularmente por camapú, balãozinho ou camamu. A partir desta planta já foram isolados diferentes flavonoides (kaempferol, quercetina, rutina), alcaloides, carotenóides, ácido ascórbico e diferentes tipos de esteroides (TOMASSINI et al., 2000). Em estudo, Soares et al., 2003, isolou moléculas (fisalinas B, F e G) e observaram grande potencial inibitório na

produção de NO por macrófagos e IFN- γ . Utilizando extrato metanólico de *P. angulata*, Hsieh et al. (2006), observaram atividade apoptótica e antiproliferativa de células cancerígenas relacionadas ao câncer de mama.

Esses achados revelam o potencial que a *P. angulata* possui como fitoterápico, podendo auxiliar no tratamento ou prevenção de variadas enfermidades. Com essas informações a presente dissertação buscou compreender os efeitos desta planta em uma linhagem de célula tumorais semelhante a neurônios.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Sistema nervoso central e o sistema imune

Células da glia, ou como também são chamadas neuroglia, e células neuronais são os principais componentes responsáveis pela formação do que conhecemos como SNC. As células neuronais são conhecidas por serem excitáveis, por essa característica ao receberem estímulos elétricos podem enviar e receber informações através de impulsos nervosos (ARAQUE & NAVARRETE, 2010).

As células da glia podem ser separadas e classificadas em dois grupos células –*macroglia e microglia*– que apresentam diferenças morfológicas e funcionais, as quais possuem sua própria origem embrionária. A macroglia é constituída por astrócitos, oligodendrócitos e epidimócitos, todos de origem ectodermal. Enquanto a microglia possui origem mesodermal (CARVALHO et al., 2013; BUTOVSKY & WEINER, 2018).

Existem fatores que favorecem a ideia do sistema nervoso central (SNC) ser uma área privilegiada no que diz respeito ao seu sistema imunológico: ausência de ligação direta do cérebro com o sistema linfático; presença da barreira hematoencefálica, realizando a divisão dos compartimentos que compreendem os vasos sanguíneos e o parênquima cerebral; presença de células apresentadoras de antígenos e aceitação de enxertos maior que em outras partes do corpo (FIGARELLA et al., 2019).

O campo da neuroimunologia, ramo que combina neurociência e imunologia, é cada vez mais estudado, pesquisas nesse campo buscam entender como funcionam as interações do sistema nervoso e do sistema imunológico, de forma recíproca, a qual se sabe que há uma neuroimunomodulação funcionando de forma bidirecional (ALVES & NETO, 2010).

Já se sabe que o sistema imune do SNC conta com as duas formas de resposta imunológica, as respostas inata e adaptativa. A resposta inata sendo responsável por apresentar uma defesa mais rápida a antígenos, não havendo o envolvimento de anticorpos ou linfócitos T com receptores específicos a antígenos. Enquanto a resposta adaptativa conta com linfócitos T específicos para o antígeno, junto a produção de anticorpos por linfócitos B para regiões presentes na medula espinhal ou cérebro (BHAT; STEINMAN, 2009).

As células da glia são responsáveis por promover a fagocitose de fragmentos celulares após lesão e morte celular, possuem função imunoprotetora e da homeostase, realizam captação de nutrientes, oxigênio, e facilitam a sinalização de sinapses entre o corpo celular, os dendritos e axônios dos neurônios, além de participarem da separação e isolamento dos grupos neurais e conexões sinápticas (TARDY, 1991; BARRES & BARDE 2000). Os astrócitos e a microglia compreendem as duas principais populações celulares capazes de reagir a danos neuronais e alterações do microambiente cerebral (STREIT et al., 1999).

Recentemente o interesse em compreender a microglia teve um considerável aumento por parte da comunidade da neurociência, que possuía maior foco nos neurônios, deixando de lado as células neurogлияis e microglia (FIGARELLA et al., 2019).

A capacidade que as células da microglia possuem de reagir a inúmeros tipos de perturbação do SNC, já lhe proporcionaram a comparação com chaves ligadesliga, devido a sua capacidade de retomar a homeostase (GOMEZ-NICOLA & PERRY, 2014). A microglia exerce uma função essencial no SNC, sendo a responsável por reconhecer e responder a patógenos e lesões, através dos seus variados mecanismos de defesa. A importância da microglia é ainda maior quando colocamos o fato de que não há células dendríticas no SNC (RANSOHOFF & BROWN, 2012).

A microglia desempenha importante papel imunológico no sistema nervoso central. No sistema sadio a microglia permanece em um estado quiescente, atuando como célula vigilante e recebendo estímulos de neurônios e outras células da glia (VIHARDT et al., 2005). Entretanto, já se sabe que as denominações “em repouso” ou mesmo “estado de quiescência”, não estão totalmente corretas, visto que essas células realizam uma constante investigação no SNC, desta forma o ideal seria citá-la como uma célula em “estado vigilante” (FIGARELLA et al., 2019). Ela possui a capacidade de limpar e eliminar focos de necroses, agente infecciosos, células em estado apoptótico, realiza a manutenção do microambiente através da fagocitose (GOMEZ-NICOLA & PERRY, 2014).

Estudos apontam para a existência de dois fenótipos microgliais que são ativados em resposta a estímulos nocivos, o perfil M1 da microglia, perfil neurotóxico e pró-inflamatório, quando ativado resulta no aumento da expressão dos marcadores de glicoproteínas transmembranares lisossomais (CD68) presentes nas células, e ao aumento da expressão de diversos tipos de citocinas e quimiocinas inflamatórias, como IL-1 β , IL-6, TNF- α , EROs (espécies reativas de oxigênio), óxido nítrico (NO), e proteínas quimiotáticas de monócitos 1 (CCL2/MCP1), nesta forma ativa a microglia recebe a denominação de amebóide ou macrófago cerebral (VIHARDT, 2005; NAKAGAWA & CHIBA, 2015; FIGARELLA et al., 2019). Outra possível resposta realizada pelas células da microglia é o aumento da expressão do receptor de manose 1 lectina tipo C (CD206), que ocorre pelo perfil de resposta M2, ou também conhecida como microglia neuprotetora, resultando na produção de citocinas regulatórias e de fatores neurotróficos, como interleucina-4 (IL-4), interleucina-10 (IL-10) e fator transformador de crescimento beta (TGF- β) (HU et al., 2012; FIGARELLA et al., 2019).

Quando os neurônios são lesionados, a ativação das células da microglia é caracterizada pela fosforilação das proteínas cinases. Sabe-se que há três distintas vias de sinalização para o recrutamento da microglia residente, as quais são estimuladas por quimiocinas CX3CL1 que atuam no receptor CX3R1, CCL2 que sinaliza para o receptor CCR2 e os receptores do tipo Toll (SCHOLZ & WOOLF, 2007).

A secreção de IL-1 β e IL-18 pela microglia induzem a produção de uma cascata de citocinas inflamatórias que diminuem a função de barreira hematoencefálica, aumentando a adesão dos leucócitos no endotélio, o que permite a passagem de

células do sistema imune adaptativo para combater a inflamação local (RANSOHOFF & BROWN, 2012).

Desta forma, podemos observar como as células microgliais desempenham papéis importantíssimos no que diz respeito à desenvolvimento, homeostase, envelhecimento, imunologia, neurodegeneração, neuroinflamação e plasticidade celular no cérebro (FIGARELLA et al., 2019).

2.2. Neurônios e Linhagens celulares PC12

O Neurônio é a unidade funcional do sistema nervoso, possuindo como principais características suas propriedades bioquímicas, com a presença de regiões pré e pós-sináptica, e a presença morfológica de três compartimentos: os dendritos, prolongamentos capazes de receber estímulos do microambiente ou outras células; o corpo celular, ou centro trófico, onde estão localizadas as organelas e núcleo celular; e o axônio, um longo prolongamento, se comparado aos dendritos, capaz de conduzir impulsos do neurônio para outras células (KANDEL et al., 2000; WIEGERT et al., 2007).

Já se sabe que as características neuronais podem apresentar diferenças no mesmo tipo de neurônio, o que está relacionado a sua função e localização (BARBOSA et al., 2003). Para compreender os tipos e níveis de conectividade do sistema nervoso, se faz necessária a compreensão da morfologia neuronal (AHNERT et al., 2009).

A classificação dos neurônios depende da morfologia, função e atividade bioquímicas presentes na célula. A forma mais conhecida para realizar a classificação de um neurônio é através das características morfológicas expressas. Desta forma, podemos avaliar os componentes estruturais do neurônio e classifica-los em três grupos: unipolar, bipolar e multipolar (KANDEL et al., 2000; KHOLODENKO, 2003).

Existem variados tipos de neurônios, que ao serem estudados contribuíram com abundantes informações a respeito da morfologia neuronal. Entretanto, mesmo com tamanha variedade morfológica os componentes neuronais são altamente sofisticados e semelhantes para realização da sinalização celular que ocorre entre as células e no próprio neurônio (TERENZIO et al., 2017). Estudos relacionados ao

entendimento da função, atividades bioquímicas e classificação dos neurônios são um trabalho árduo, devido custos, viabilidade e outras limitações (ASCOLI et al., 2007). Uma alternativa para tais problemas é a utilização de linhagem celulares.

A linhagem de células imortais PC12 é utilizada em diferentes tipos de estudos relacionados ao sistema nervoso, fornecendo informações de grande relevância devido a sua similaridade com neurônios. Essas células podem ser estimuladas com fator de crescimento neuronal (NGF), fazendo com que as características morfológicas de um neurônio simpático sejam expressadas, apresentando estruturas como neuritos e potencial de membrana excitável, adotando características mais adrenérgicas (GREENE & TISCHLER, 1976; GREENE & REIN, 1977).

Os neuritos são considerados filamentos ou prolongamentos de células neurais, e fazem parte da etapa inicial na formação de axônios e dendritos, sendo fundamental para a diferenciação neuronal e comunicação sináptica, podendo ser regulados por pequenas moléculas denominadas neurotrofinas (SAINATH & GALLO 2015).

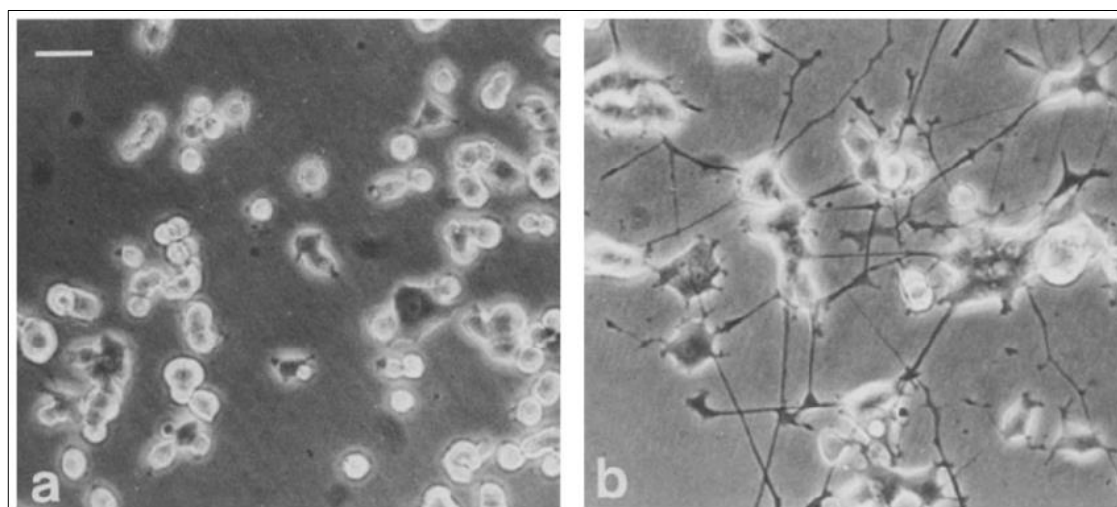
As neurotrofinas pertencem a uma família de proteínas responsáveis por regular crescimento de neuritos, a diferenciação de neurônios e a manutenção da rede sináptica no SNC, desempenhando um papel extremamente importante para a sobrevivência dos neurônios durante a vida do indivíduo (McALLISTE, 2001; SOFRONIEW et al., 2001).

As células PC12 são células neoplásicas originadas de tumor neuroendócrino de glândula adrenal de ratos, denominado feocromocitoma adrenal (PC12), o seu isolamento ocorreu em 1976, no Centro Médico Beth Israel Deaconess, Boston-USA. Os pesquisadores observaram que após a exposição ao fator de crescimento nervoso (NGF), as células interromperam o processo de multiplicação e apresentaram alterações na morfologia, alongamentos semelhantes aos observados em cultura de neurônios simpáticos. Também foi possível observar que as células PC12 foram capazes de sintetizar e armazenar neurotransmissores como catecolaminas, dopamina e norepinefrina (GREENE & TISCHLER 1976).

Os motivos pelos quais as células PC12 são tão populares estão relacionados principalmente à sua extrema versatilidade para manipulação farmacológica,

facilidade de cultura, grande quantidade de conhecimento prévio sobre sua proliferação e diferenciação, e por sua contribuição como modelo de estudos neurobiológicos, neuroimunológicos e neuroquímicos (GREENE & TISCHLER 1976 ; WESTERINK & EWING, 2007).

Essas células são utilizadas como modelo de estudos há muitas décadas, algumas razões pelas quais essa linhagem celular é utilizada, estão relacionadas a sua capacidade de mesmo sendo uma célula tumoral conseguir interromper sua atividade mitótica, apresentar fenótipos característicos de neurônios, e poder ser utilizadas como modelo de neurosecreção (WESTERINK & EWING, 2007). A exposição ao fator de crescimento neuronal (NGF) e o fator de crescimento de fibroblastos 1 (FGF1) ativam a diferenciação e apresentação fenotípica de neuritos de longa ramificação, semelhante ao que é visto em neurônios (SIMONE et al., 2003; JIANG & WANG, 2020) (Figura 1).



Fonte: (DRUBIN et al., 1985)

Figura 1. Crescimento de neuritos em células PC12 na presença contínua de NGF. (a) Células indiferenciadas. (b) Células cultivadas em 100 ng/mL de NGF por 5 d. Bar, 20/~m. x 400.

A utilização de células PC12 já auxiliou em estudos que comprovaram que a rutina (bioflavonóide obtido de plantas) é capaz de modular os genes celulares promovendo a proteção celular e consequentemente evitando a morte de células neuronais quando submetida a danos (MAGALINGAM et al., 2015).

Células da linhagem PC12 também são amplamente utilizadas como modelos de neurosecreção e neurobiológicos. Assim como observados em células cromafins

adrenais, as células PC12 são capazes de sintetizar e armazenam dopamina e em alguns casos noradrenalina, as quais podem ser liberadas após a despolarização dependente de Ca²⁺ (GREENE & REIN 1977).

A exposição de células PC12 a l-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), resulta no aumento do número de vesículas e de saturação de dopamina no interior da célula. Como citado anteriormente células PC12 também podem sofrer diferenciação quando expostas a NGF, essa diferenciação não afeta a produção de catecolaminas produzidas por essas células (WESTERINK & EWING, 2007).

Quando tratadas com dexametasona, um potente glicocorticoide sintético usado como anti-inflamatório e imunossupressor, as células PC12 sofrem diferenciação, tornando-se células neuroendócrinas, semelhante ao que ocorre com células cromafina quanto expostas a dexametasona (ELHAMDANI et al., 2000).

Outra contribuição dos estudos com células PC12 foi no entendimento das funções do complexo SNARE, que são importantes para maquinaria de fusão célula-célula, onde foi observado que a ruptura do complexo SNARE ou a clivagem das proteínas SNARE impedem o encaixe, a iniciação e a liberação da vesícula (FISHER & BURGOYNE 1999). Ao utilizarem um gene mutante para expressar a proteína de membrana SCAMP2 em células PC12, Liu e colaboradores (2005), observaram que essa alteração acarretou na inibição de exocitose nas células, prejudicando a formação de poros de fusão.

Em virtude do caráter ético, simplicidade, custo, conhecimento e compreensão das funções, essa linhagem celular se revela como ótima candidata para criar um microambiente semelhante as células do sistema nervoso, o que auxilia nos estudos neurofarmacológicos e neurotoxicológicos (GREENE & TISCHLER, 1976; STANSLEY et al., 2012; BARBOSA et al., 2015).

2.3 Plantas medicinais, aspectos históricos e *Physalis angulata*

A ciência que estuda a utilização de produtos de origem vegetal com finalidade terapêutica é a Fitoterapia, prevenindo, atenuando e/ou curando um estado patológico (CARVALHO, 2012). Em diversas épocas e culturas o ser humano fez uso das plantas

medicinais como uma forma de melhorar a saúde e também para prolongar a vida (SILVA et al., 2012; JAMSHIDI-KIAL et al., 2018).

Fitoterápicos são plantas medicinais que passam por um procedimento industrializado para se obter um medicamento, essas plantas são utilizadas para fins medicinais capazes de aliviar ou curar enfermidades e apresentam uma tradição de uso como medicamento em grupos de indivíduos, como uma população ou comunidade (BRASIL, 2016; SANTIC et al., 2017). O processamento das plantas medicinais é realizado para evitar contaminações por substâncias estranhas e até mesmo microrganismo, serve também para padronizar a quantidade e método de aplicação para aumentar a segurança ao se utilizar a planta (BRASIL, 2016; HOSSEINPOUR-JAGHDANI et al., 2017).

Evidências históricas apontam que há aproximadamente 60 mil anos, plantas já eram utilizadas para o tratamento de doenças (JÜTTE et al., 2017). O primeiro documento escrito que se tem conhecimento sobre a utilização de plantas como medicamentos foi encontrado em uma obra chinesa denominado Pen Ts'ao, atualmente denominado “*A Grande Fitoterapia*”, foi escrito pelo imperador Shen Nung, no período de 2800 a.C. e apresentava 365 ervas medicinais (KASOTE et al., 2017).

Métodos químicos e analíticos para a extração de princípios ativos de plantas foram realizados pela primeira vez em laboratório entre os anos de 1803 e 1808, o que deu início ao isolamento e estudo de diversos princípios ativos de plantas. Após essas descobertas, pesquisas passaram a ser realizadas para modificar as substâncias naturais para torná-las mais seguras e mais eficazes (YUNES; CECHINEL FILHO, 2001; SCHULZ et al, 2002).

Uma dessas plantas pertence ao gênero *Phylaxis* que está dentro da Família Solenaceae, contando com aproximadamente 100 espécies, possui características arbustivas, ramificada e anual, dentre essas espécies algumas se destacam com importância econômica e farmacológica, como a *Phylaxis angulata* L., *P. peruviana* L., *P. pubescens* L., *P. viscosa* L. (SOARES et al., 2003; DAMU et al., 2007; CRUZ et al., 2015; MUNIZ et al., 2015) (Figura 2).

As espécies de *Physalis* por conterem em sua composição uma série de compostos esteroidais, elas se tornaram amplamente estudadas na medicina em todo

o mundo (MARTINEZ, 1998). A *Physalis angulata* está distribuída por praticamente todas as regiões tropicais e subtropicais no globo, sendo uma promissora fonte de substâncias bioativas naturais (NOGUEIRA et al., 2013).

P. angulata conhecida popularmente por camapú, balãozinho, ou camamu, é originária do Norte do Brasil, estando distribuída em todas as regiões do território brasileiro, sendo utilizada pela medicina popular para tratamentos infecciosos ocasionados por parasitos e bactérias, doenças reumáticas, dermatites e doenças relacionadas com o sistema nervoso (RENGIFO-SALGADO & VARGAS-ARANA 2013). Essa planta também é utilizada como analgésico para o tratamento de dores de garganta e dores abdominais, antidiurético, anti-inflamatório para casos de hepatite e cervicite, antinociceptivo e antipirético (BRUSTOLIM et al., 2010).



Figura 2. Aspectos morfológicos de *Physalis angulata*. Em (A) Caules e Flor; (B) Folhas; (C) Fruto totalmente desenvolvido; (D) conjunto de flor, frutos e folhas. Adaptada, Horto didático de plantas medicinais do HU/CCS – UFSC, 2020.

A partir da *P. angulata*, já foram isolados flavonoides (kaempferol, quercetina, rutina), alcaloides, carotenóides, ácido ascórbico e diferentes tipos de esteroides (TOMASSINI et al., 2000). Soluções utilizando extrato de *P. angulata*, já demonstraram ações anti-inflamatórias e imunomoduladoras. Em estudo, Soares et al., 2003,

isolaram moléculas (fiscalinas B, F e G) e observaram grande potencial inibitório na produção de NO por macrófagos e IFN- γ .

Por meio de análises fitoquímicas realizadas com o gênero *Physalis*, foram revelados através de isolamento a presença de diversos compostos fisiologicamente ativos, formados principalmente por esteroides (KUO et al., 2006). Posteriormente, análises fitoquímicas da *P. angulata* revelaram a presença de sete novos vitaesteroides, considerados precursores de fiscalinas uma nova fiscalina denomina W, juntamente com outros compostos como fiscalinas A, B, D, F, G, I, J, T, U e V (DAMU et al., 2007). (Figura 3).

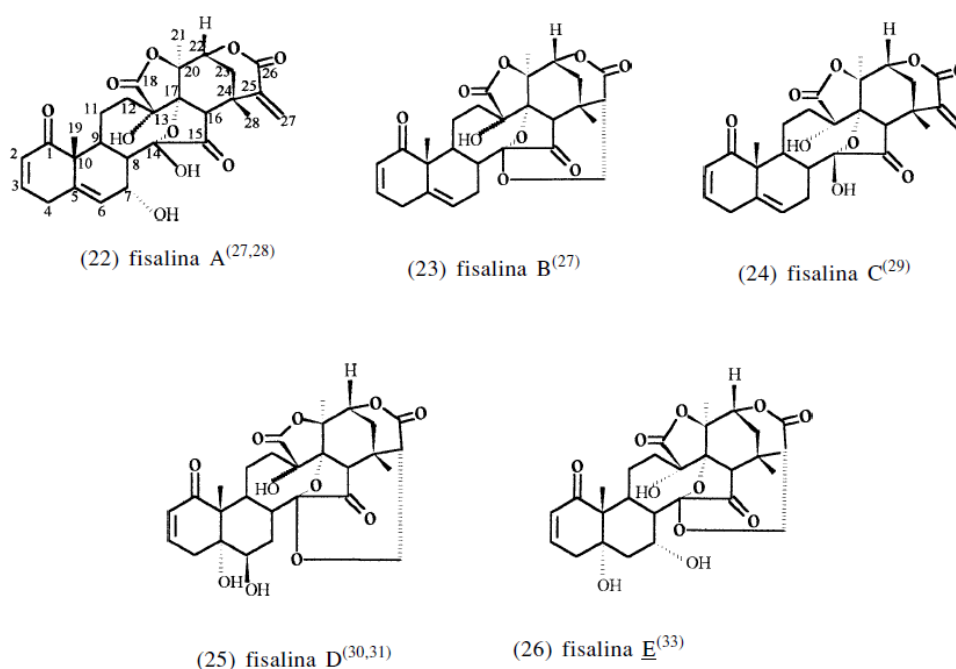


Figura 3. Estruturas moleculares das fiscalinas A, B, C, D e E. (TOMASSINI, 2000).

As fiscalinas são moléculas esteróides modificadas obtidas de espécies de *Physalis* spp., essas moléculas possuem ações imunossupressoras em culturas de macrófagos e inibem a produção de mediadores pró-inflamatórios de linfócitos *in vitro* (BRUSTOLIM et al., 2010).

Efeitos antitumorais já foram relatados em estudos com a *P. angulata*, onde a fisalina F, obtidas do extrato etanólico de toda a planta, apresentou citotoxicidade contra oito diferentes linhagens de células tumorais: cinco oriundas de tumores humano; e três de tumores animais (CHIANG, et al., 1992).

Soares et al. (2003), observaram que a adição de fisalinas B, F ou G em culturas de macrófagos expostos a lipopolissacarídeos (LPS) e interferon- γ (IFN- γ), desempenhou ação anti-inflamatória ao reduzir a produção de óxido nítrico (NO), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 6 (IL-6) e interleucina-12 (IL-12). O mesmo grupo de pesquisadores observou atividades supressoras, em um outro estudo, utilizando as fisalinas B, F ou G no tratamento de camundongos que experimentalmente passaram por transplante de coração, o que revelou um potencial imunossupressor das fisalinas no tratamento de patologias onde é desejada a inibição da resposta imunológica (SOARES et al., 2006).

Analisando constituintes da *P. angulata*, Nagafuji et al, (2004), relataram atividade citotóxica, *in vitro*, contra células de carcinoma de útero. Também foi relatado nesse estudo uma promissora atividade anti-tripomastigota de *Trypanosoma cruzi*.

Usando fisalinas para o tratamento de camundongos portadores de isquemia intestinal e reperfusão, Vieira et al. (2005), puderam constatar que essas moléculas possuem uma potente atividade anti-inflamatória, pois obtiveram considerável redução das lesões antes observadas.

Utilizando extrato metanólico de *P. angulata*, Hsieh et al. (2006), observaram atividade apoptótica e antiproliferativa de células cancerígenas relacionadas ao câncer de mama.

Estudos realizados com extrato aquoso liofilizado das raízes de *P. angulata* (AEPa) já demonstraram significativas atividades antiinflamatórias e imunomodulatórias ao interferir na via da ciclooxigenase, proliferação de linfócitos, redução da produção de NO e TGF-beta, controlando a resposta inflamatória induzida pela aplicação de carragenina no subcutâneo de ratos (BASTOS et al., 2008).

As fisalinas B e F já demonstraram ação antileishmania, em estudos *in vitro* utilizando culturas de macrófagos e *in vivo* utilizando camundongos, ambos infectados com Leishmania, foi possível observar que o tratamento com fisalina resultou na redução do tamanho de lesões, da carga parasitária e alterações histopatológicas (GUIMARÃES et al., 2009).

Em estudos utilizando camundongos com artrite, induzidos experimentalmente, foram comparados os tratamentos com dexametasona e a fisalina F, a ação das duas moléculas foi muito semelhante e satisfatória (BRUSTOLIM et al., 2010). Por outro lado, o mesmo grupo observou que mudando o modelo de estudo para camundongos portando inflamação alérgica das vias aéreas, a fisalina F não demonstrou efeitos (BRUSTOLIM et al., 2010).

Nogueira et al. (2013), observaram que o extrato etanólico concentrado de *Physalis angulata* (EEPA) demonstrou uma promissora ação farmacológica antileishmania em estudo *in vitro* utilizando as formas promastigotas de *L. amazonenses* e *L. braziliensis*.

O uso de plantas e seus derivados com ações farmacocinética e farmacodinâmica desconhecidas podem representar sérios riscos à saúde, podendo ocasionar adversidades quanto a absorção, distribuição, metabolização e até mesmo excreção quando administrados em conjunto com outro medicamento. Parte dessas adversidades estão relacionadas as moléculas bioativas, ou também conhecidas como metabólitos secundários, presentes nas plantas como óleos essenciais, taninos, alcaloides, flavonoides, esteroides, dentre outros (SKALLI & BENCHEIKH, 2012)

Deste modo, o atual trabalho buscou compreender ações moduladoras e citotóxicas do extrato etanólico de *Physalis angulata* em cultura de células PC12.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do extrato bruto etanólico de *Physalis angulata* (EEPA), *in vitro*, em cultura de linhagem celular PC12.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar e comparar o metabolismo celular de cultura de células PC12 tratadas com diferentes concentrações de EEPA.
- Verificar e avaliar os efeitos das diferentes concentrações de EEPA na morfologia e proliferação de células de linhagem PC12;
- Determinar analisar os níveis de óxido nítrico na linhagem de células PC12 tratadas com diferentes concentrações de EEPA;

4 CAPÍTULO 1: Artigo Científico: Extrato etanólico de *Physalis angulata* reduz a produção de óxido nítrico em células PC12

4.1 Introdução

As buscas por compostos bioativos de origem vegetal para o tratamento de enfermidades estão se tornando cada vez maiores, assim como o número de tratamentos naturais para fins medicinais. Dentre esses tratamentos não convencionais se destaca a utilização do gênero *Physalis*, com seus frutos, caule e folhas, dos quais já foram obtidas inúmeras moléculas com atividades metabólicas, principalmente os vitaesteróides (LIN et al., 1992; TOMASSINI et al., 2000; SOARES et al., 2006; Newman & Cragg, 2012; FERNANDES et al., 2018).

Physalis angulata (família Solanaceae) é uma planta arbustiva encontrada em regiões com climas tropical e subtropical que se destaca por sua importância farmacológica. Essa planta está difundida em áreas de climas tropicais e subtropicais da África, Ásia e América, presente no norte e nordeste do Brasil (CORRÊA, 1926; SOARES et al., 2003; NAGAFUJI et al., 2004; DAMU et al., 2007; CRUZ et al., 2015; MUNIZ et al., 2015; RENGIFO-SALGADO & VARGAS-ARANA 2013).

Popularmente conhecida no Brasil como camapú, balãozinho, ou camamu, a *P. angulata* é utilizada na medicina tradicional como analgésico para o tratamento de dores de garganta e dores abdominais, antidiurético, antitumoral, analgésico, anti-leishmania, anti-trypanosoma, anti-inflamatório para casos de hepatite e cervicite, antinociceptivo, antipirético, antirreumático, imunossupressora e sedativo (CHIANG, et al., 1992; SOARES et al., 2003; VIEIRA et al., 2005; BASTOS et al., 2006; BASTOS, 2008; BRUSTOLIM et al., 2010; NOGUEIRA et al., 2013).

Atividades imunossupressoras foi analisada por Brustolim et al. (2010), ao utilizarem a fisalina F, observaram que essa molécula derivada da *P. angulata*, foi capaz de reduzir edema e inflamação nas articulações de camundongos com artrite, porém, não apresentou alterações em inflamação alérgica.

Utilizando o EEPA, Nogueira et al. (2013), observaram atividade antileishmania em testes *in vitro*, utilizando cultura de macrófagos de ratos que foram infectados

experimentalmente com *Leishmania amazonenses* e *Leishmania braziliensis*. Na conclusão os autores afirmaram que o EEPA não apresentou efeitos mutagênicos, mas sim um efeito tóxico contra *Leishmania*.

Devido as suas inúmeras aplicações no tratamento de enfermidades, a *P. angulata* vem sendo amplamente estudada em diferentes modelos de estudos. Desta forma, decidimos analisar seus possíveis efeitos em cultura de células PC12.

Um modelo de estudos que está ganhando cada vez mais espaço são as linhagens de células imortais, a exemplo a linhagem de células PC12, oriundas de feocromocitoma murino, que são amplamente utilizadas como modelos de neurosecreção e neurobiológicos (WESTERINK & EWING, 2007). As células PC12 apresentam-se como ótima alternativa quanto ao caráter ético, simplicidade, custo, conhecimento e compreensão das funções celulares, se assemelhando a células do sistema nervoso, auxiliando em estudos neurofarmacológicos e neurotoxicológicos (GREENE & TISCHLER, 1976; STANSLEY et al., 2012; BARBOSA et al., 2015).

Células PC12 ao serem expostas a neurotrofinas, como fator de crescimento nervoso (NGF), passam a expressar características de neurônios, sendo capazes de formar estruturas como os neuritos (McALLISTE, 2001; SOFRONIEW et al., 2001). Estímulos para formação de neuritos podem auxiliar no tratamento de doenças degenerativas, uma vez que a reconstrução das sinapses e redes neuronais podem promover a recuperação das funções cerebrais, perdidas durante uma neurodegeneração (TOHDA et al., 2005).

Diante disso, avaliamos o potencial citotóxico e modulador do extrato etanólico de *Physalis angulata* (EEPA) em células da linhagem PC12 não diferenciadas.

4.2 Materiais e métodos

Extrato etanólico de *Physalis angulata*

Para obtenção do extrato etanólico bruto de *Physalis angulata* (EEPA) o grupo de pesquisa utilizou caules da planta provenientes do campo experimental da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, na cidade de Cruz das Almas, Bahia, Brasil (FREITAS et al., 2019).

Após a coleta, o material passou por processo de higienização e foi colocado em uma estufa de circulação de ar, para sua secagem, posteriormente os caules foram triturados em moinho de facas, com o objetivo de obter-se 500g de matéria seca triturada. Em seguida foi feita a extração dos metabólitos secundários, através de maceração exaustiva em etanol P.A., sendo realizadas coletas a cada 72h do solvente, que foi filtrado e substituído por um novo, tal procedimento foi repetido 3 vezes. O conteúdo obtido das extrações foi submetido à destilação do solvente em evaporador rotatório, sob pressão reduzida a uma temperatura média de 50°C. Para garantir a evaporação total do etanol, o extrato obtido foi colocado em capela de exaustão e pesado diariamente até não apresentar mais variação de massa (FREITAS et al., 2019).

A análise química do EEPA foi realizada por espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-EM/EM) em um espectrômetro de massas linear íon trap (Thermo Scientific LTQ, San Jose, CA, USA). As condições de espectrometria de massa foram as seguintes: voltagem do spray utilizada foi 3.98 kV; temperatura do capilar 219°C; pressão do gás nitrogênio utilizada foi 100 psi; e o fluxo do solvente (metanol com hidróxido de amônia 1%) foi 5 µL/min. O espectro full scan do extrato foi obtido numa faixa de massa de 140-800 m/z. Uma energia de 20% foi aplicada para realizar a fragmentação (EMn) dos picos (FREITAS et al., 2019).

Preparo da cultura

As células PC12 utilizadas no experimento foram obtidas através do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), localizado em Duque de Caxias – RJ.

As células PC12 foram cultivadas em placas de culturas de células aderentes contendo meio Dulbecco modification of Minimum Essential Media (DMEM) (Gibco,

Grand Island, NY). Para a suplementação foram utilizados 10% de soro equino (HS), 10% de soro fetal bovino (FBS), 4 mM de L-glutamina, 0,6% de glicose. Como medida de segurança foi feita a adição da associação de dois antibióticos (100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, Gibco®). Em seguida as placas foram levadas para incubação a 37 °C em câmara de cultura, saturada com 5% de CO₂. As células foram tripisinizadas quando as culturas atingiram a confluência, onde foram destacadas das placas de cultura com auxílio de uma solução salina tamponada com fosfato (PBS, 1x) contendo 0,05% de tripsina e 0,02% de EDTA. Em seguida, as células foram centrifugadas a 1.000 RPM. A contagem das células foi realizada utilizando uma câmara de Neubauer, em seguida semeadas na concentração de $x 10^4$ células/cm² em placas de 96 poços e colocadas em uma incubadora com 5% CO₂ a 37 °C durante 24h.

Ensaio de citotoxicidade

A citotoxicidade do EEPA às culturas foi determinada através da utilização do brometo de 3- (4,5-dimetiltiazolil-2) -2,5-difeniltetrazólio (MTT).As culturas foram expostas ao EEPA (0,5; 1; 5; 10; 25; 50; 75; 100, 125; 150µg/mL) por 24h. Após o período de exposição ao EEPA, foi feita a substituição do meio de cultura por solução de MTT (10 µL/poço) a uma concentração final de 1 µg/mL, por duas horas na estufa a 37°C com 5% de CO₂. Em seguida foram adicionados 100 µL/poço de tampão de lise (pH 4,7) (20% de SDS e 50% de DMF), as placas foram mantidas overnight em temperatura ambiente e as leituras foram realizadas em absorbância de 540nm (Thermo Plate, modelo TP Reader - tipo B, Varioskan Flash Thermo Científico).

Inicialmente foi realizado um screening com as concentrações que seriam utilizadas, foram feitos dois experimentos independentes, com oito repetições. Posteriormente o ensaio MTT foi realizado com as concentrações que apresentaram as melhores taxas de viabilidade celular, sendo realizados dois experimentos independentes com oito repetições.

Avaliação da integridade celular - Corante Rosenfeld

A integridade celular foi avaliada através de técnica tintorial utilizada na hematologia, conhecida como coloração de Rosenfeld, que se trata da combinação

dos corantes May-Grunwald e Giemsa. A técnica foi aplicada após o período de 24h após o tratamento com EEPA e fixação das células com metanol.

Após o período de tratamento as células foram lavadas com solução salina (PBS) para remover o meio de cultivo. As células foram fixadas com metanol a -20 °C por 10 minutos, cobrindo todo o tapete celular. Depois de retirar o excesso e deixar secar, as células foram cobertas com o corante Rosenfeld por 3 minutos. Em seguida foram adicionadas 20 gotas de água destilada e após a homogeneização as células ficaram expostas por mais 20 minutos. Por fim as células foram lavadas com água destilada e após secarem foram analisadas em microscopia de contraste de fase. As fotos foram retiradas na objetiva 20x, equivalente a 100µm, no microscópio de fluorescência Olympus BX-2; Olympus, Melville, New York, USA . E em seguida foi realizada a contagem de células através do software ImageJ v1.33u (Wayne Rasband, Institutos Nacionais de Saúde, EUA). Para cada tratamento, foram contadas todas as células em cada um dos oito campos separados.

Dosagem de Óxido Nítrico

O nível de óxido nítrico foi determinado através da mensuração do nitrito utilizando o método de Griess. Após o período de exposição, o meio de cultura foi recolhido e distribuído, em triplicata, em placas de 96 poços. Posteriormente foi adicionada solução de Griess (1% de sulfanilamida e 0,1% de naftil-etilenediamina em 5% de ácido fosfórico) e a leitura em absorbância medida a 540nm em leitor de placas (Thermo Plate, modelo TP Reader - tipo B, Varioskan Flash Thermo Scientific). As concentrações de NO foram calculadas a partir dos valores de curva padrão de nitrito de sódio e posteriormente foi feita a normatização com os valores obtidos da dosagem de proteínas.

Extração e quantificação de proteínas

Após serem cultivadas e expostas por 24h ao tratamento com as diferentes concentrações de EEPA, as células de linhagem PC12 foram retiradas da placa com a auxílio do *scrap* e tampão de extração celular com inibidor de protease e em seguidas armazenadas em microtubos. As amostras foram submetidas a temperatura de -70°C até o momento da quantificação.

Análise estatística

Os resultados foram analisados pelo programa estatístico GraphPadPrism 7.0 (California, EUA) e os dados expressos em média \pm desvio padrão dos parâmetros avaliados. A normalidade dos dados foi avaliada através do teste Shapiro-Wilk. Para avaliar a diferença estatística dos dados paramétricos foi realizado o teste One Way ANOVA. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados com significância estatística. Foram utilizados os pós test de Tukey, para comparar os todas as médias com todas as outras médias, e o pós test de Dunnet, para comparar todas as médias com a média do grupo controle.

4.3 Resultados

4.3.1 Screening de Citotoxicidade do EEPA em Linhagem PC12

Inicialmente foi realizada uma triagem para que fosse possível determinar quais concentrações entre 0,5 e 150 $\mu\text{g/mL}$ não apresentaram citotoxicidade as células PC12 (Figura 4). A solução salina (PBS), foi utilizada como controle negativo. É possível observar que a viabilidade celular foi muito reduzida nas concentrações 25, 50, 75, 100, 125 e 150 $\mu\text{g/mL}$.

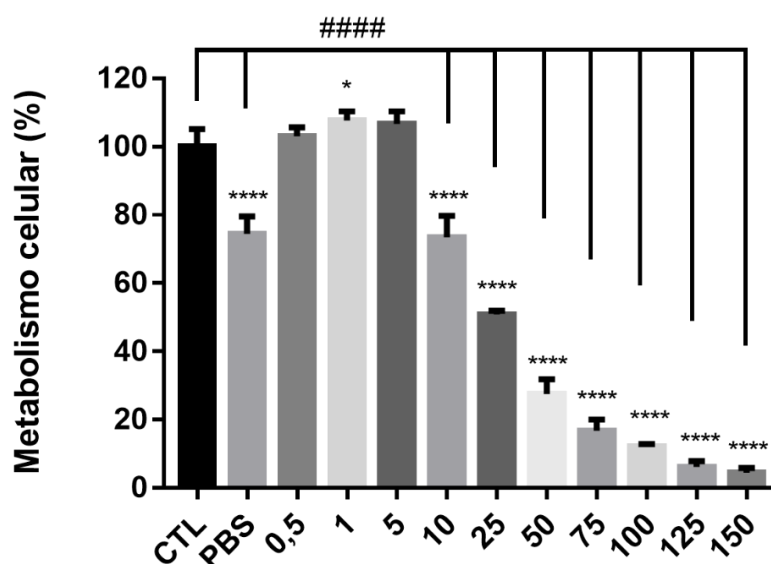


Figura 4. Análise do efeito do EEPA nas concentrações 0,5 ; 1; 5; 10; 25; 50; 75; 100; 125 e 150 $\mu\text{g/mL}$, na viabilidade de células PC12. Resultados expressos em média e desvio padrão. A significância estatística foi obtida utilizando o teste One way ANOVA seguido do pós-teste Dunnett, com (*) representando a diferença estatística entre o grupos controle e os demais grupos tratamento, com valor de $p < 0,05$ e (****) $p < 0,0001$. E pós-teste de Tukey (#), com (#####) equivalente a $p < 0,0001$.

Após a triagem foram selecionadas as concentrações 0,5; 1; 5 e 10 µg/mL do EEPA, por apresentarem as melhores taxas de viabilidade celular. O controle negativo utilizado foi o veículo de diluição do tratamento (DMSO 0,1%) (Figura 4).

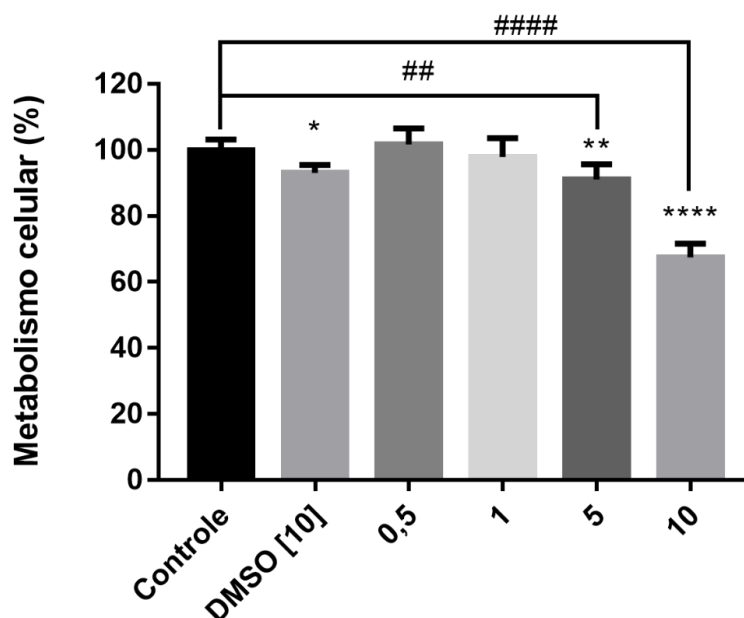


Figura 5. Avaliação do efeito do EEPA nas concentrações 0,5 ; 1; 5; 10 µg/mL, na viabilidade de células PC12. Resultados expressos em média e desvio padrão. A significância estatística foi obtida utilizando o teste One way ANOVA seguido dos pós-testes de Dunnett (*) e Tukey (#), apresentando a diferença estatística entre o grupos controle e os demais grupos tratamento, com valores de (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$; (****) $p < 0,0001$; (##) $p > 0,005$; (#####) $p < 0,0001$.

4.3.2 Níveis de NO das células PC12 tratadas com EEPA

Para determinação da concentração de NO, seus valores de absorvância em D.O. 570nm foram medidos e referidos a uma curva padrão (solução de nitrito de sódio). Os valores de NO foram normalizados pelos valores de proteína encontrados e são expressos na figura 6. É possível observar que os valores de NO sofreram reduções significativas nas concentrações de 0,5; 1 e 10µg/mL em relação ao grupo controle.

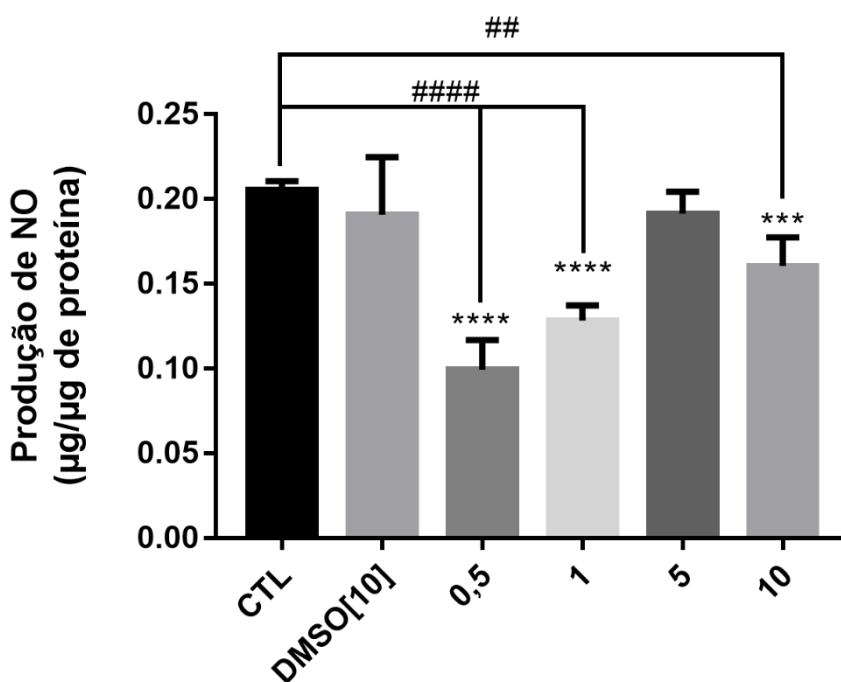


Figura 6. Dosagem de Nitrito em células PC12 expostas a EEPA (0,5; 1; 5 e 10 µg/mL) por 24h. Os dados estão apresentados em média \pm DP, com (*) e (#) representando a diferença estatística entre o grupos controle e os demais grupos tratamento, com valor de (***) $p < 0,001$; (****) equivalente a $p < 0,0001$; (##) $< 0,01$ e (#####) $< 0,0001$. Teste estatístico One-Way Anova seguido dos pós-testes Dunnett (*) e Tukey (#).

4.3.3 Contagem de células PC12 tratadas com EEPA - Coloração Rosenfeld

As células foram coradas através do método Rosenfeld, em seguida foram realizadas a captura de imagens e a contagem de células, onde foi possível notar alterações na morfologia (Figura 7), sendo feita a contagem (Figura 9), e proliferação (Figura 8), ocasionadas pelo EEPA.

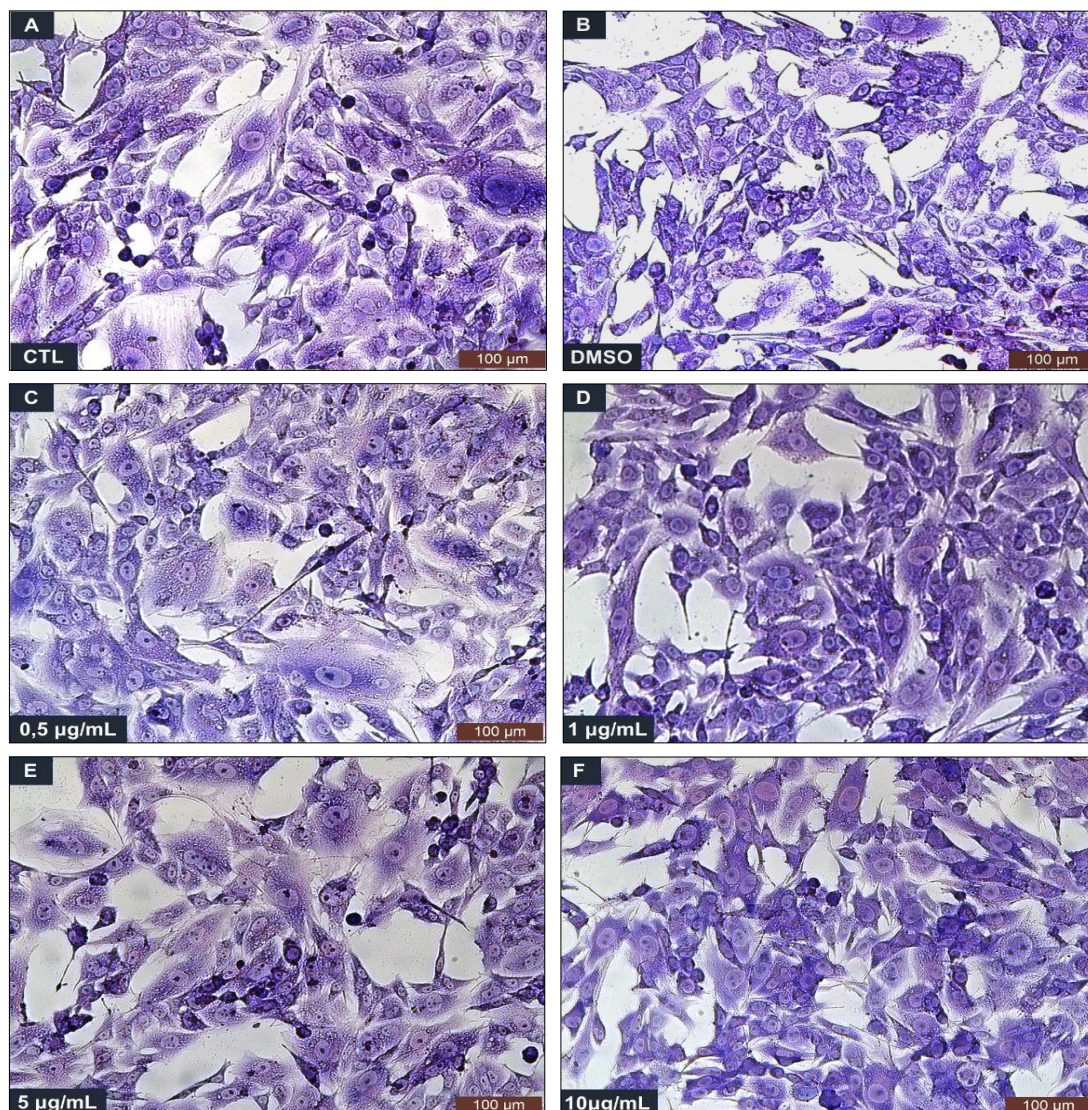


Figura 7. Coloração Rosenfeld para análise da morfologia e quantificação de células PC12 . Cultura de células PC12 após o tratamento com diferentes concentrações de EEPA. Corante Rosenfeld. Imagens obtidas por microscopia na objetiva 20x. Em **A** - Controle (DMEM); **B** - Controle (DMSO); **C** - Tratamento 0,5 µg/mL; **D** – Tratamento 1 µg/mL ; **E** – Tratamento 5 µg/mL ; **F** - Tratamento 10 µg/mL.

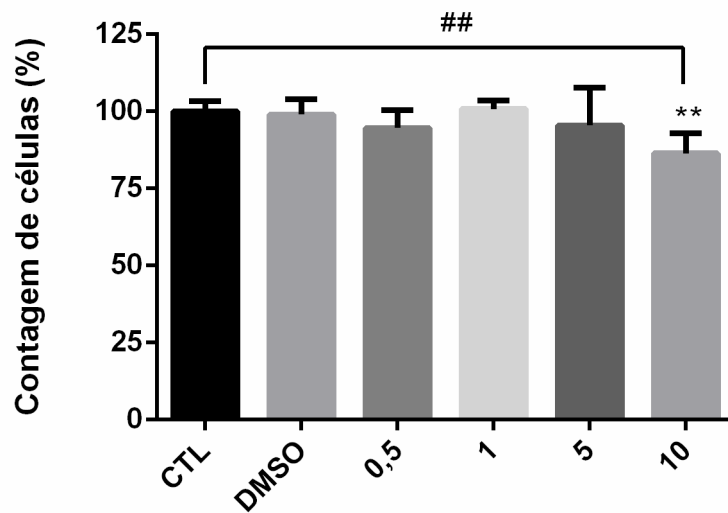


Figura 8. Contagem de células PC12 expostas a EEPA (0,5; 1; 5 e 10µg/mL). Coloração pelo método de Ronsenfeld e contagem de células utilizando o programa ImageJ. Os dados são apresentados em média ± DP, com significância estatística (**) p<0,01 e (##) p<0,01. Resultados avaliados pelo teste estatístico: One-Way Anova seguido dos pós-testes de Dunnett (*) e Tukey(#).

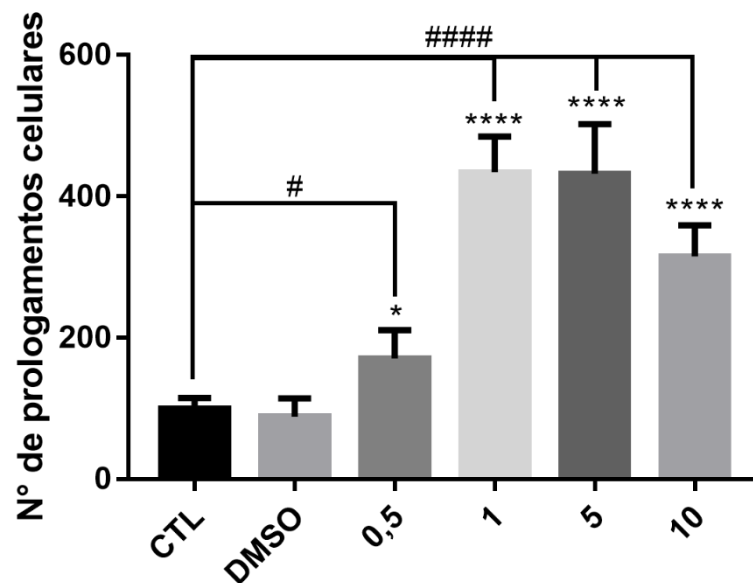


Figura 9. Contagem dos prolongamentos celulares. Células PC12 expostas a EEPA (0,5; 1; 5 e 10µg/mL). Coloração pelo método de Ronsenfeld e contagem de filamentos utilizando o programa ImageJ. Os dados são apresentados em média ± DP, com significância estatística (*) p<0,05, (****) p<0,0001 e (#####) p<0,0001. Resultados avaliados pelo teste estatístico: One-Way Anova seguido dos pós-testes de Dunnett (*) e Tukey(#).

4.4 Discussão

Novas drogas são obtidas através de estudos realizados com produtos naturais, como é o caso de plantas medicinais, por possuírem diversas moléculas com atividades farmacológicas (LI & VEDERAS, 2009). O extrato etanólico de *Physalis angulata* utilizado no presente estudo foi analisado em estudos anteriores realizados pelo grupo, sendo constatado a presença do flavonoide rutina e de 3 diferentes fisalinas (A, B e E) (FREITAS, 2019). Nossos resultados sugerem que o tratamento com EEPA em células de linhagem PC12, nas concentrações de 0,5; 1 e 5 µg/mL, não apresentam efeitos citotóxicos, conforme observado no ensaio MTT (Figura 5) e na contagem de células (Figura 8). Efeitos pró-inflamatórios também não foram observados, através da dosagem de NO (Figura 6). Porém foi possível observar alterações da morfologia das células (Figura 7).

Physalis angulata tem sido estudada e utilizada no tratamento de enfermidades como neoplasias, artrites, malária, hepatite, leishmaniose, tripanossomíase (CHIANG, et al., 1992; LIN, et al., 1992; NAGAFUJI et al., 2004; HSIEH et al., 2006; GUIMARÃES, 2009; BRUSTOLIM et al., 2010; NOGUEIRA et al., 2013). Com base nesses e outros estudos foi visto a importância da *P. angulata* e sua atividade biológica, desta forma, investigamos o efeito tóxico e modulador do extrato etanólico em células de linhagem PC12.

No ensaio de MTT, os resultados obtidos revelaram que o EEPA nas concentrações 0,5 e 1 µg/mL apresentou viabilidade celular igual ao grupo controle. Enquanto que a concentração 5 µg/mL, apresentou uma leve redução da viabilidade, 91%. Já a concentração de 10 µg/mL apresentou uma citotoxicidade superior a 33%. Estudos já demonstraram que a utilização de compostos isolados da *P. angulata*, como fisalinas (B e D) e Withangulatina (B) nas concentrações de 0,2 a 1,6 µg/mL foram extremamente tóxicas em células de linhagem tumoral humana (DAMU et al., 2007). Guimarães et al., (2009) utilizaram as fisalinas B, F e D, compostos isolados da *P. angulata*, em cultura de células de macrófagos e não observaram citotoxicidade nas concentrações de 2 µg/mL. Avaliando a ação citotóxica do EEPA em macrófagos peritoneais, Nogueira e colaboradores (2013), observaram que nas concentrações superiores a 11 µg/mL o extrato apresentou 100% de citotoxicidade, enquanto que na concentração 3,7 µg/mL não foram observados efeitos tóxicos do EEPA.

Na análise por microscopia foi possível observar que as células apresentaram morfologia poligonal, característica que observadas em ambos os grupos, controles e tratamentos. Entretanto, o tratamento com o EEPA induziu mudanças morfológicas nas culturas de células PC12, nas concentrações de 0,5; 1; 5 e 10µg/mL, apresentando finas estruturas prolongadas semelhantes a neuritos, redução do corpo celular e conformações em esferas. Esses achados foram semelhantes aos estudos realizados por Sagara e colaboradores (2004), que ao tratarem células PC12 com variadas concentrações de flavonoides (1, 5, 10 e 20µM) observaram o aumento da atividade neuroprotetora e promotora de crescimento de neuritos. Estudos realizados para avaliar a qualidade de bioativos e atividade antioxidante da *Physalis* sp. já demonstraram que essa planta possui diferentes tipos de flavonoides em sua composição como: kaempferol, quercetina, rutina (TOMASSINI et al., 2000). Em estudos recentes realizados por Anh e colaboradores (2020), através de análises de espectrometria de massa de ionização por eletrospray de alta resolução e reatividade química (FREITAS, 2019) foi possível isolar três novos flavanoides na *P. angulata*. A presença desses flavonoides no EEPA pode ter ocasionado as alterações morfológicas descritas anteriormente no nosso trabalho.

Na contagem de células utilizando o método de Rosenfeld seguido da contagem pelo software ImageJ, foi possível observar uma redução significativa do número de células viáveis na concentração de 10µg/mL (Figura 8). Indicando citotoxicidades as células PC12 nessa concentração, o que corrobora com as reduções de metabolismo celular observadas nos ensaios MTT (Figura 4 e 5) e redução dos níveis de óxido nítrico (Figura 6). Também foi possível observar que o EEPA foi capaz promover o aumento do número de estruturas filamentosas, principalmente nas concentrações de 1 e 5 µg/mL (Figura 9), com um aumento de . Esses achados sugerem que o EEPA possui potencial neurotrófico, assim como os achados encontrados nos estudos realizados por Greene e Rein (1977), e Drubin e colaboradores (1985), ao utilizarem fatores de diferenciação neuronal em células PC12.

A molécula de óxido nítrico possui importante papel em variados sistemas biológicos auxiliando na sinalização celular atuando em processos fisiológicos e patológicos (FILHO & ZILBERTSTEIN, 2000; YOON et al., 2002). Em condições

fisiológicas o NO pode atuar como mensageira ou mesmo neurotransmissora. Enquanto que em condições patológicas podem ser observados aumentos na concentração de NO no organismo, junto a outras moléculas como citocinas, agindo como agente antimicrobiano, antitumoral, vasodilatador e no processo inflamatório (MOSHAGE et al., 1995; DUSSE et al., 2005). Altos níveis de NO podem causar alterações nas membranas celulares e conseqüentemente afetar sua permeabilidade. Resultando em incapacidade de realizar trocas iônicas, liberação de conteúdo presente nas organelas (enzimas hidrolíticas lisossomais) e posteriormente a morte celular (NAKAMURA; LIPTON, 2009).

No presente estudo foi possível observar que o tratamento com EEPA induziu uma redução na produção de NO nas concentrações 0,5; 1 e 10µg/mL. As concentrações de 0,5µg/mL e 1 µg/mL chamam atenção por terem apresentado redução de NO de aproximadamente 50% e 35%, respectivamente, quando comparadas ao grupo controle (Figura 6). Enquanto que na concentração de 5µg/mL o EEPA manteve a produção de NO igual a observada no grupo controle. A redução observada na concentração 10µg/mL pode estar relacionada a redução de células viáveis, como observado no ensaio MTT, para avaliar o metabolismo celular (Figuras 4 e 5). Resultados semelhantes foram observados por Guimarães et al. (2009), analisando cultura de macrófagos infectados com *Leishmania* e tratados com Fisalinas B e F (2µg/mL). Bastos et al. (2008) observaram que o extrato aquoso liofilizado das raízes de *P. angulata*, foi capaz de reduzir em 60% a produção de NO em modelos *in vivo* desafiados com carragenina (1%), na concentração de 1mg/kg, com aplicação intraperitoneal. Brustolim et al. (2010) associou a Fisalina F de *P. angulata*, a inibição da produção de NO por macrófagos desafiados com LPS, em estudo utilizando modelos *in vivo* que receberam 5 doses orais de 60mg/kg da fisalina. Um estudo recente realizado por Sun et al. (2017) revelou que o extrato etanólico das fisalinas A, B, D, E, F, G, I e H, isoladas de caules e folhas de *P. angulata*, apresentaram capacidade de reduzir a produção de NO em macrófagos desafiados com LPS. Soares et al., 2003, isolaram moléculas (fisalinas B, F e G) e observaram grande potencial inibitório na produção de NO por macrófagos e IFN-γ. Nosso trabalho fortalece os demais estudos que indicam que o EEPA é capaz de reduzir a produção de NO, podendo afetar os mecanismos de imuno regulação e processos inflamatórios

relacionado a essa molécula. Podendo auxiliar na redução do NO em situações em que a hiperprodução dessa molécula se torna prejudicial para o microambiente celular.

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, para melhor compreensão dos efeitos do tratamento utilizando o EEPA, são necessárias análises complementares para comprovação de efeitos não citotóxicos, imunomoduladores e neurotróficos das concentrações utilizadas em cultura de células PC12.

4.5 Referência

ANH, H.L.T.; BA, V.L.; DO, T.T.; PHAN, V.K.; THI, H.Y.P.; BACH, L.G.; TRAN, M.H.; THI, P.A.T.; KIM, Y.H. Bioactive compounds from *Physalis angulata* and their anti-inflammatory and cytotoxic activities. **J Asian Nat Prod Res**. 23(8):809-817. Oct 2020.

BARBOSA, S.B.; SANTOS, F.A.; PIMENTEL, M.M.L.; FERNADES, D.P.; PREXEDES, E.A.; BEZERRA, M.B. **Brazilian Journal of Hygiene and Animal Sanity** (v.9, n.2) (2015) 334-347.

BASTOS, G.N.T., SANTOS, A.R.S., FERREIRA, V.M.M., COSTA, A.M.R., BISPO, C.I., SILVEIRA, A.J.A., DO NASCIMENTO, J.L.M. Antinociceptive effect of the aqueous extract obtained from roots of *Physalis angulata* L. on mice. **Journal of Ethnopharmacology** 103, 241–245, 2006.

BASTOS, G.N.; SILVEIRA, A.J.; SALGADO, C.G. DINIZ, D.L.P.; NASCIMENTO, J.L. *Physalis angulata* extract exerts anti-inflammatory effects in rats by inhibiting different pathways. **J. Ethnopharmacol.** v. 118, p. 246-251. 2008. BOATRIGHT K. M.; SALVESEN G. S. Mechanisms of caspase activation. **Curr. Opin. Cell Biol.** 15: 725-31. 2003.

BRUSTOLIM, D.; VASCONCELOS, J.F.; FREITAS, L.A.R.; TEIXEIRA, M.M.; RIBEIRO, Y.M.; TOMASSINI, T.C.B.; OLIVEIRA G.G.S.; SANTOS, R.R; SOARES, M.B.P. Activity of Physalin F in a Collagen-Induced Arthritis Model. **J. Nat. Prod.** v.73, p. 1323–1326, 2010.

CHIANG, H.C.; JAW, S.M.; CHEN, C.F.; KAN, W.S. Antitumor agent, physalin F from *Physalis angulata* L. **Anticancer Res**; 12: 837–43. 1992.

CORRÊA, M. P. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil, Rio de Janeiro: vol.I. **directoría Geral de Estatística** 26, 408–409, 1926.

CRUZ, J. L.; SOUZA FILHO, L.F.S.; PELACANI, C.R.. Influência da adubação fosfatada sobre o crescimento do camapu (*Physalis angulata* L.). **Rev. bras. plantas med.** [online]. 2015, vol.17, n.3, pp.360-366.

DAMU, A.G.; KUO, P.C.; SU, C.R.; KUO, T.H.; CHEN, T.H.; BASTOW, K.F.; LEE, K.H.; WU, T.S. Isolation, Structures, and Structure-Cytotoxic Activity Relationships of Withanolides and Physalins from *Physalis angulata*. **J. Nat. Prod.**v. 70, p. 1146-1152. 2007.

DRUBIN, D.G.; FEINSTEIN, S.C.; SHOOTER, E.M.; KIRSCHNER, M. W. Nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells involves the coordinate induction of microtubule assembly and assembly-promoting factors. **J Cell Biol.** 101(5 Pt 1) p.1799-807. Nov. 1985.

DUSSE, L.M.S.A.; SILVA, R.M.M.; VIEIRA, L.M.; CARVALHO, M. G. Does plasma nitrite determination by the Griess reaction nitric oxide synthesis? **Clin. Chim. Acta.** v.362, p.195-197, 2005.

FERNANDES, Annayara CF et al. Sensorial, antioxidant and antimicrobial evaluation of vinegars from surpluses of physalis (*Physalis pubescens* L.) and red pitahaya (*Hylocereus monacanthus*). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2018.

FILHO, R.F.; ZILBERSTEIN B. Óxido nítrico: o simples mensageiro passando pela complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Rev. Assoc. Med. Bras.** 46 (3). p.265-71. 2000.

FREITAS, Luciana dos Santos. **Avaliação de diferentes compostos em culturas de células gliais de rato infectadas com *Neospora caninum***. Orientador: Alexandre Moraes Pinheiro. 2019. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia. Salvador-BA, 2019. Disponível em: https://sigaa.ufba.br/sigaa/public/programa/defesas.jsf?lc=pt_BR&id=1824. Acesso em 14/07/22.

GUIMARÃES, E.T.; LIMA, M.S.; SANTOS, L.A.; RIBEIRO, I.M.; TOMASSINI, T.B.C.; SANTOS, R.R.; SANTOS, W.L.C.; SOARES, M.B.P. Activity of physalins purified from *Physalis angulata* in in vitro and in vivo models of cutaneous leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy.** v.76, p. 1-4. 2009.

HSIEH, W. T.; HUANG, K.Y.; LIN, H.Y.; CHUNG, J.G. Physalis angulata induced G2/M phase arrest in human breast cancer cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 7, p. 974–983, jul. 2006.

GREENE, L.A.; REIN, G. Release of (3H) norepinephrine from a clonal line of pheochromocytoma cells (PC12) by nicotinic stimulation. **Brain Res.** 138, 521-528. 1977.

GREENE, L.A.; TISCHLER, A.S. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. **Proc Natl Acad Sci USA** 73, 2424–2428. 1976.

LI, J.W.H.; VEDERAS, J.C. Drug Discovery and Natural Products: End of an Era or an Endless Frontier? **Science**. v. 325, n°5937, p.161-165. 2009.

LIN, Y.S.; CHIANG, H.C.; KAN, W.S.; HONE, E.; WON, M.H. Immunomodulatory activity of various fractions derived from *Physalis angulata* L. extract. **Am J Chin Med**; 20: 233–43, 1992.

MARTIN, S. J.; CONOR, M. H.; SEAN, P.C. A perspective on mammalian caspases as positive and negative regulators of inflammation. **Molec. Cell.** 46 (4). 2012.

McALLISTE, A.K. Neurotrophins and neuronal differentiation in the central nervous system. **Cell Mol Life Sci.** v. n°8 p. 1054-60. 2001.

MUNIZ, J.; MOLINA, R. A.; MUNIZ, J. Physalis: Panorama produtivo e econômico no Brasil. **Hortic. Bras.** vol.33 no.2 Vitoria da Conquista Apr./June 2015.

NAGAFUJI S.; OKABE, H.; AKAHANE E. Trypanocidal constituents in plants. 4. Withanolides from the aerial parts of *Physalis angulata*. **Biol Pharm Bull**; 27: 193–7. 2004.

NAKAMURA, T.; LIPTON, S.A. Cell death: protein misfolding and neurodegenerative diseases. **Apoptosis.**, v. 14, p.455-468, 2009.

NEWMAN, D.J., CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **J. Nat. Prod.** 75, 311–335. 2012.

NOGUEIRA, R.C.; ROCHA, V.P.C.; NONATO, F.R.; TOMASSINI, T.C.B.; IVONE, M.R.; SANTOS, R.R.; SOARES, M.B.P. Genotoxicity and antileishmanial activity evaluation of *Physalisangulata* concentrated ethanolic extract. **environmental toxicology and pharmacology**. v. 36, p.1304–1311. 2013.

RENGIFO-SALGADO, E.; VARGAS-ARANA, G. *Physalis angulata* L. (Bolsa Mullaca): a review of its traditional uses, chemistry and pharmacology. **Bol. latinoam. Caribe plantas med. aromát**; 12(5): 431-445, sept. 2013.

SAGARA, Y.; VANHNASY, J.; MAHER, P. Induction of PC12 cell differentiation by flavonoids is dependent upon extracellular signal-regulated kinase activation. **Jour of Neuroc**. 90, 1144-1155, 2004.

SOARES, M.B.P.; BELLINTANI, M.C.; RIBEIRO, I.M.; TOMASSINI, T.C.B.; SANTOS, R.R. Inhibition of macrophage activation and lipopolysaccharide-induced death by seco-steroids purified from *Physalis angulata* L. **European Journal of Pharmacology**, v. 459 p. 107–112, 2003.

SOFRONIEW, M.V.; HOWE, C. L.; MOBRELY, W.C. Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. **Annu Ver Neurosci**. v. 24, p. 1217-81, 2001.

STANSLEY, B.; POST, JAN; HENSLEY, K. A comparative review of cell culture systems for the study of microglial biology in Alzheimer's disease. **Journal of Neuroinflammation**, 9:115. 2012.

SUN, C. P.; QIU, C.Y.; ZHAO, F.; KANG, N.; CHEN, L.X.; QIU, F. Physalins V-IX, 16,24-cyclo-13,14-seco withanolides from *Physalis angulata* and their antiproliferative and anti-inflammatory activities. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 1 dez. 2017.

TOHDA, C.; KUBOYAMA, T.; KOMATSU, K. Search for natural products related to regeneration of the neuronal network. **Neurosignal**, v. 14, n° 1-2, p. 34-45, 2005.

TOMASSINI, T. C. B.; BARBI, S. N.; RIBEIRO, M. I. XAVIER, D. C. D. Gênero *Physalis*-uma revisão sobre vitasteróides. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 6, 2000.

VIEIRA, A. T.; PINHO, V.; LEPSCH, L. B.; SCAVONE, C.; RIBEIRO, I. M.; TOMASSINI, T.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; SOARES, M. B.; TEIXEIRA, M. M.;

SOUZA, D. G. Mechanisms of the anti-inflammatory effects of the natural secosteroids physalins in a model of intestinal ischaemia and reperfusion injury. **Br. J. Pharmacol.** v.146, p. 244–251. 2005.

WESTERINK, R.H.S.; EWING, A.G. The PC12 cell as model for neurosecretion. **Acta Physiol**, 192(2):273-85. Feb, 2007.

YOON, S.; MOON J., SHIN, C.; KIM, E.; JO, S.A.; JO, S. Smoking status-dependent association of the 27-bp repeat polymorphism in intron 4 of endothelial nitric oxide synthase gene with plasma nitric oxide concentrations. **Clin. Chim. Acta.** v. 324, p.113-120, 2002.

5 CONCLUSÃO GERAL

- O extrato etanólico bruto de caule de *Physalis angulata* não apresentou citotoxicidade ou redução do número de células PC12 nas concentrações 0,5; 1 e 5µg/mL.
- O tratamento com EEPA alterou a morfologia poligonal das células PC12, reduzindo o corpo celular ocasionando o surgimento de células em formato de esfera e surgimento de finos filamentos.
- O tratamento com EEPA modula negativamente a produção de óxido nítrico em células PC12.
- São necessários mais estudos para analisar os efeitos imunomoduladores e antitumorais do EEPA sobre as células PC12.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (todas as referências da tese)

AHNERT, S.E.; TRAVENÇOLO, B.A.N.; COSTA, L.F. Connectivity and dynamics of neuronal networks as defined by the shape of individual neurons. **New Journal of Physics**, Volume 11, October 2009.

ALVES, G.J.; NETO, J.P. Neuroimmunomodulation: influences of the immune system about the nervous system. **Rev Neurocienc**; 18(2):214-219. jan, 2010.

AMARAL, J.B.; SANTELLI, M.G.M. 3D cell culture and its application in studies related to lumen formation. **Rev. Naturalia**, RC, v.34, p. 1-20, 2011.

ANH, H.L.T.; BA, V.L.; DO, T.T.; PHAN, V.K.; THI, H.Y.P.; BACH, L.G.; TRAN, M.H.; THI, P.A.T.; KIM, Y.H. Bioactive compounds from *Physalis angulata* and their anti-inflammatory and cytotoxic activities. **J Asian Nat Prod Res**. 23(8):809-817. Oct 2020.

ARAQUE, A.; NAVARRETE, M. Glial cells in neuronal network function. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**. 12;365(1551):2375-81. Aug 2010.

ASCOLI, G.A.; DONOHUE, D.E.; HALAVI, M. NeuroMorpho. Org: a central resource for neuronal morphologies. **J Neurosci**. 29;27(35):9247-51. Aug, 2007.

BARBOSA, S.B.; SANTOS, F.A.; PIMENTEL, M.M.L.; FERNADES, D.P.; PREXEDES, E.A.; BEZERRA, M.B. **Brazilian Journal of Hygiene and Animal Sanity** (v.9, n.2) (2015) 334-347.

BARRES, B.A.; BARDE, Y. Neuronal and glial cell biology. **Curr Opin Neurobiol**. 10(5):642-8. Oct 2000.

BASTOS, G.N.T., SANTOS, A.R.S., FERREIRA, V.M.M., COSTA, A.M.R., BISPO, C.I., SILVEIRA, A.J.A., DO NASCIMENTO, J.L.M. Antinociceptive effect of the aqueous extract obtained from roots of *Physalis angulata* L. on mice. **Journal of Ethnopharmacology** 103, 241–245, 2006.

BASTOS, G.N.; SILVEIRA, A.J.; SALGADO, C.G. DINIZ, D.L.P.; NASCIMENTO, J.L. *Physalis angulata* extract exerts anti-inflammatory effects in rats by inhibiting different pathways. **J. Ethnopharmacol**. v. 118, p. 246-251. 2008.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Política e Programa Nacional de Plantas

Medicinais e Fitoterápicos / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. – **Brasília: Ministério da Saúde**, 2016. 190 p.

BHAT, R.; STEINMAN, L. Innate and adaptive autoimmunity directed to the central nervous system. **Neuron Cambridge**, v. 64, n. 1, p. 123-132, out. 2009.

BRUSTOLIM, D.; VASCONCELOS, J.F.; FREITAS, L.A.R.; TEIXEIRA, M.M.; RIBEIRO, Y.M.; TOMASSINI, T.C.B.; OLIVEIRA G.G.S.; SANTOS, R.R; SOARES, M.B.P. Activity of Physalin F in a Collagen-Induced Arthritis Model. **J. Nat. Prod.** v.73, p. 1323–1326, 2010.

BUTOVSKY, O.; WEINER, H. L. Microglial signatures and their role in health and disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 19, n. 10, p. 622–635, 2018.

CARVALHO, F.; GOMES, A.; PEREIRA TORTELLI E LUAN DINIZ, V. Glia: dos velhos conceitos às novas funções de hoje e as que ainda virão. **Estudos Avançados**, v. 27, n. 77, p. 61–84, 2013.

CARVALHO, J. C. T. **Formulário Médico-Farmacêutico de Fitoterapia**. 3ª Edição. São Paulo: Pharmabooks, 365p. 2012.

CHIANG, H.C.; JAW, S.M.; CHEN, C.F.; KAN, W.S. Antitumor agent, physalin F from *Physalis angulata* L. **Anticancer Res**; 12: 837–43. 1992.

CORRÊA, M. P. Dicionario das Plantas Uteis do Brasil, Rio de Janeiro: vol.I. directoria Geral de Estatística 26, 408–409, 1926.

CRUZ, J. L.; SOUZA FILHO, L.F.S.; PELACANI, C.R.. Influência da adubação fosfatada sobre o crescimento do camapu (*Physalis angulata* L.). **Rev. bras. plantas med.** [online]. 2015, vol.17, n.3, pp.360-366.

DAMU, A.G.; KUO, P.C.; SU, C.R.; KUO, T.H.; CHEN, T.H.; BASTOW, K.F.; LEE, K.H.; WU, T.S. Isolation, Structures, and Structure-Cytotoxic Activity Relationships of Withanolides and Physalins from *Physalis angulata*. **J. Nat. Prod.**v. 70, p. 1146-1152. 2007.

DRUBIN, D.G.; FEINSTEIN, S.C.; SHOOTER, E.M.; KIRSCHNER, M. W. Nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells involves the coordinate

induction of microtubule assembly and assembly-promoting factors. **J Cell Biol.** 101(5 Pt 1) p.1799-807. Nov. 1985.

DUSSE, L.M.S.A.; SILVA, R.M.M.; VIEIRA, L.M.; CARVALHO, M. G. Does plasma nitrite determination by the Griess reaction nitric oxide synthesis? **Clin. Chim. Acta.** v.362, p.195-197, 2005.

ELHAMDANI, A.; BROWN, M.E.; ARTALEJO, C.R.; PALFREY, H.C. Enhancement of the dense-core vesicle secretory cycle by glucocorticoid differentiation of PC12 cells: characteristics of rapid exocytosis and endocytosis. **J Neurosci.** 20(7):2495-503. Apr 2000.

FERNANDES, Annayara CF et al. Sensorial, antioxidant and antimicrobial evaluation of vinegars from surpluses of physalis (*Physalis pubescens* L.) and red pitahaya (*Hylocereus monacanthus*). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2018.

FIGARELLA, K.; WOLBURG, H.; GASCHUK, O.; DUSZENKO, M. Microglia in neuropathology caused by protozoan parasites. **Biological Reviews Biol Rev Camb Philos Soc.** 95(2):333-349. Nov, 2019.

FILHO, R.F.; ZILBERSTEIN B. Óxido nítrico: o simples mensageiro passando pela complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Rev. Assoc. Med. Bras.** 46 (3). p.265-71. 2000.

FISHER, R.J.; BURGOYNE, R.D. The effect of transfection with Botulinum neurotoxin C1 light chain on exocytosis measured in cell populations and by single-cell amperometry in PC12 cells. **Pflugers Arch.** 437(5):754-62. Apr 1999.

FREITAS, Luciana dos Santos. **Avaliação de diferentes compostos em culturas de células gliais de rato infectadas com *Neospora caninum*.** Orientador: Alexandre Moraes Pinheiro. 2019. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia. Salvador-BA, 2019. Disponível em: https://sigaa.ufba.br/sigaa/public/programa/defesas.jsf?lc=pt_BR&id=1824. Acesso em 14/07/22.

GOMEZ-NICOLA, D.; PERRY, V. H. Microglial Dynamics and Role in the Healthy and Diseased Brain: A Paradigm of Functional Plasticity. **The Neuroscientist**, Baltimore, v. 21, n. 2, p. 169-184, abr. 2015.

GREENE, L.A.; TISCHLER, A.S. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. **Proc Natl Acad Sci USA** 73, 2424–2428. 1976.

GREENE, L.A.; REIN, G. Release of (3H) norepinephrine from a clonal line of pheochromocytoma cells (PC12) by nicotinic stimulation. **Brain Res.** 138, 521-528. 1977.

GUIMARÃES, E.T.; LIMA, M.S.; SANTOS, L.A.; RIBEIRO, I.M.; TOMASSINI, T.B.C.; SANTOS, R.R.; SANTOS, W.L.C.; SOARES, M.B.P. Activity of physalins purified from *Physalis angulata* in in vitro and in vivo models of cutaneous leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.76, p. 1-4. 2009.

HAYDON, P.G. Neuroglial networks: neurons and glia talk to each other. **Curr Biol**.v.19, p. 12-14, 2000.

HOSSEINPOUR-JAGHDANI, F.; SHOMALI, T.; GHOLIPOUR-SHAHRAKI S.; RAHIMI-MADISEH, M.; RAFIEIAN-KOPAEI M. *Cornus mas*: a review on traditional uses and pharmacological properties. **Journal of Complementary and Integrative Medicine**, 14(3), 2017.

HSIEH, W. T.; HUANG, K.Y.; LIN, H.Y.; CHUNG, J.G. *Physalis angulata* induced G2/M phase arrest in human breast cancer cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 7, p. 974–983, jul. 2006.

HU, X. et al. Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia. **Stroke**, v. 43, n. 11, p. 3063–3070, 2012.

JAMSHIDI-KIAL, F.; LORIGOOINI, Z.; AMINI-KHOEI, H. Medicinal plants: Past history and future perspective. **J Herbmed Pharmacol**. [7](#): 1-7. 2018

JIANG, BP; LE, L.; XU, L.J.; XIAO, P.G. Minocycline inhibits ICAD degradation and the NF- κ B activation induced by 6-OHDA in PC12 cells. **Brain Res.** 1586, 1–11, 2014.

JIANG, J.; WANG, G. Matrine protects PC12 cells from lipopolysaccharide-evoked inflammatory injury via upregulation of miR-9. **Pharmaceutical Biology**, v. 58, n. 1, p. 314-320, 2020.

JÜTTE, R., HEINRICH, M., HELMSTÄDTER, A., LANGHORST, J., MENG, G., NIEBLING, W. TRAMPISCH, H. J. Herbal medicinal products – Evidence and tradition from a historical perspective. *Journal of Ethnopharmacology*, 207, 220–225. 2017.

KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSELL, T.M. **Principles of neural science**. 4.ed. McGraw-Hill, 2000.

KASOTE, D. M. et al. Herbal remedies for urinary stones used in India and China: A review. **Journal Of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 203, p.55-68, 2017.

KHOLODENKO, B.N. Four-dimensional organization of protein kinase signaling cascades: The roles of diffusion, endocytosis and molecular motors. **J. Exp. Biol.** 206, 2073–2082. 2003.

KUO, P.C.; KUO, T.H.; DAMU, A.G.; SU, C.R.; LEE, E.J.; WU, T.S.; SHU, R.; CHEN, C.M.; BASTOW, K.F.; CHEN, T.H.; LEE, K.H. Withangulatin I, a New Cytotoxic Withanolide from *Physalis angulata*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin. Org. Lett.** v.8, p. 2953-2956. 2006.

LI, J.W.H.; VEDERAS, J.C. Drug Discovery and Natural Products: End of an Era or an Endless Frontier? **Science**. v. 325, n°5937, p.161-165. 2009.

LIN, Y.S.; CHIANG, H.C.; KAN, W.S.; HONE, E.; WON, M.H. Immunomodulatory activity of various fractions derived from *Physalis angulata* L. extract. **Am J Chin Med**; 20: 233–43, 1992.

LIU, L.; LIAO, H.; CASTLE, A.; ZHANG, J.; CASANOVA, J. SZABO, G.; CASTLE, D. SCAMP2 interacts with Arf6 and phospholipase D1 and links their function to exocytotic fusion pore formation in PC12 cells. **Mol Biol Cell.**16(10):4463-72. Oct 2005.

MACHADO, A.B.M. **Neuroanatomia funcional**. 1 ed. Sao Paulo: Editora Atheneu, 1998

MAGALINGAM, K. B.; RADHAKRISHNAN, A.; RAMDAS, P.; HALEAGRAHARA, N. Quercetin glycosides induced neuroprotection by changes in the gene expression in a cellular model of Parkinson's disease. **Journal of Molecular Neuroscience**. v. 55, p. 609–617, 2015.

- MARTINEZ, M. ReVision of *Physalis* section *Epeteiorhiza* (Solanaceae); *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México: Serie Botánica*, 1998; Vol. 69, pp 71-117.
- McALLISTE, A.K. Neurotrophins and neuronal differentiation in the central nervous system. *Cell Mol Life Sci.* v. n°8 p. 1054-60. 2001.
- McGARRY, L.M.; PACKER, A.M.; FINO, E.; NIKOLENKO, V.; SIPPY, T.; YUSTE, R. Quantitative classification of somatostatin positive neocortical interneurons identifies three interneuron subtypes. *Front Neural Circuits.* 14;4:12. May 2010.
- MOSHAGE, H.; KOK, B.; HUIZENGA J.R.; JANSEN, P.L.M. Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. *Clin Chem.* 41: 892–6. 1995.
- MUNIZ, J.; MOLINA, R. A.; MUNIZ, J. *Physalis*: Panorama produtivo e econômico no Brasil. *Hortic. Bras.* vol.33 no.2 Vitoria da Conquista Apr./June 2015.
- NAGAFUJI S.; OKABE, H.; AKAHANE E. Trypanocidal constituents in plants. 4. Withanolides from the aerial parts of *Physalis angulata*. *Biol Pharm Bull*; 27: 193–7. 2004.
- NAKAGAWA, Y.; CHIBA, K. Diversity and plasticity of microglial cells in psychiatric and neurological disorders. *Pharmacology and Therapeutics*, v. 154, p. 21–35, 2015.
- NAKAMURA, T.; LIPTON, S.A. Cell death: protein misfolding and neurodegenerative diseases. *Apoptosis.*, v. 14, p.455-468, 2009.
- NEWMAN, D.J., CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.* 75, 311–335. 2012.
- NOGUEIRA, R.C.; ROCHA, V.P.C.; NONATO, F.R.; TOMASSINI, T.C.B.; IVONE, M.R.; SANTOS, R.R.; SOARES, M.B.P. Genotoxicity and antileishmanial activity evaluation of *Physalis angulata* concentrated ethanolic extract. *Environmental toxicology and pharmacology.* v. 36, p.1304–1311. 2013.
- RENGIFO-SALGADO, E.; VARGAS-ARANA, G. *Physalis angulata* L. (Bolsa Mullaca): a review of its traditional uses, chemistry and pharmacology. *Bol. latinoam. Caribe plantas med. aromát*, 12(5): 431-445, sept. 2013.

RANSOHOFF, R. M.; BROWN, M. A. Innate immunity in the central nervous system. **The Journal of clinical investigation**, New Haven, v. 122, n. 4, p. 1164-1171, abr. 2012.

SANTIC, Z.; BENDAVAL, M.; GALIC, K. The historical use of medicinal plants in traditional and scientific medicine. *Psychiatria Danubina*, Vol. 29, Suppl. 4, pp S787–S792 **Medicina Academica Mostariensia**, Vol. 5, No. 1-2, pp 69-74, 2017.

SAGARA, Y.; VANHNASY, J.; MAHER, P. Induction of PC12 cell differentiation by flavonoids is dependent upon extracellular signal-regulated kinase activation. **Jour of Neuroc.** 90, 1144-1155, 2004.

SAINATH, R.; GALLO, G. Cytoskeletal and signaling mechanisms of neurite formation. **Cell Tissue Res**, v.359, n°1, p. 267-78. 2015.

SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. The neuropathic pain triad: Neurons, immune cells and glia. **Nature Neuroscience**, v. 10, n. 11, p. 1361–1368, 2007.

SCHULZ, V., HANSEL, R.; TYLER, V. E. **Fitoterapia Racional: um guia de fitoterapia para as ciências da saúde**. Manole. São Paulo, 2002. Tradução de Glenda M. de Sousa.

SILVA, L. W. S; HORA, F. L; SILVA, J. de S; FERRAZ, B. T.; SANTOS, D. C. L.; FRANÇA, C. L.; SANTANA, S. de; RIBEIRO, L. V. B; AGUIAR, D. S. Fitoterapia: uma tecnologia de cuidado proximal comunitária à pessoa idosa e sua família – práticas populares aliadas aos conhecimentos científicos. **Revista Kairós Gerontologia**, São Paulo, v. 15, n. 2, p. 35-35, março de 2012.

SIMONE, R. AJMONE-CAT, M.A.; TIRASSA, P.; MINGHETTI, L. Apoptotic PC12 cells exposing phosphatidylserine promote the production of anti-inflammatory and neuroprotective molecules by microglial cells. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 62, n. 2, p. 208-216, 2003.

SKALLI S.; BENCHEIKH, R. S. Safety monitoring of herb-drug interactions. **Grug Safety**, 35 (10): p.785-791; 2012.

SOARES, M.B.P.; BELLINTANI, M.C.; RIBEIRO, I.M.; TOMASSINI, T.C.B.; SANTOS, R.R. Inhibition of macrophage activation and lipopolysaccharide-induced death by seco-

steroids purified from *Physalis angulata* L. **European Journal of Pharmacology**, v. 459 p. 107–112, 2003.

SOARES, M.B.P.; BRUSTOLIM, D.; SANTOS, L.A.; BELLINTANI, M.C.; PAIVA, F.P.; RIBEIRO, Y.M.; TOMASSINI T.C.B.; SANTOS, R.R. Physalins B, F and G, seco-steroids purified from *Physalis angulata* L., inhibit lymphocyte function and allogeneic transplant rejection. **International Immunopharmacology**, v. 6, p. 408–414, 2006.

SOFRONIEW, M.V.; HOWE, C. L.; MOBRELY, W.C. Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. **Annu Rev Neurosci**. v. 24, p. 1217-81, 2001.

STANSLEY, B.; POST, JAN; HENSLEY, K. A comparative review of cell culture systems for the study of microglial biology in Alzheimer's disease. **Journal of Neuroinflammation**, 9:115. 2012.

STREIT, W.J.; WALTER, S.A.; PENNELL, N.A. Reactive microgliosis. **Prog Neurobiol**. 57(6):563-81. Apr 1999.

TARDY M. Astrocyte et homeostasie. **Med Sci (Paris)**. 8 (7):799–804. 1991.

TERENZIO, M.; SCHIAVO, G.; FAINZILBER, M. Compartmentalized Signaling in Neurons: From Cell Biology to Neuroscience. **Neuron**, 96(3), 667–679. 2017.

TOHDA, C.; KUBOYAMA, T.; KOMATSU, K. Search for natural products related to regeneration of the neuronal network. **Neurosignal**, v. 14, n° 1-2, p. 34-45, 2005.

TOMASSINI, T. C. B.; BARBI, S. N.; RIBEIRO, M. I. XAVIER, D. C. D. Gênero *Physalis*-uma revisão sobre vitasteróides. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 6, 2000.

VIEIRA, A. T.; PINHO, V.; LEPSCH, L. B.; SCAVONE, C.; RIBEIRO, I. M.; TOMASSINI, T.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; SOARES, M. B.; TEIXEIRA, M. M.; SOUZA, D. G. Mechanisms of the anti-inflammatory effects of the natural seco-steroids physalins in a model of intestinal ischaemia and reperfusion injury. **Br. J. Pharmacol**. v.146, p. 244–251. 2005.

VIHARDT, F. Microglia: phagocyte and glia cell. **Int J Biochem Cell Biol**. 37(1):17-21. Jan 2005.

WESTERINK, R.H.S.; EWING, A.G. The PC12 cell as model for neurosecretion. **Acta Physiol**, 192(2):273-85. Feb, 2007.

WIEGERT, J.S.; BENGTON, C.P.; BADING, H. Diffusion and not active transport underlies and limits ERK1/2 synapse-to-nucleus signaling in hippocampal neurons. **J. Biol. Chem.** 282, 29621–29633. 2007.

YOON, S.; MOON J., SHIN, C.; KIM, E.; JO, S.A.; JO, S. Smoking status-dependent association of the 27-bp repeat polymorphism in intron 4 of endothelial nitric oxide synthase gene with plasma nitric oxide concentrations. **Clin. Chim. Acta.** v. 324, p.113-120, 2002.

YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.; FILHO, V. C. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, 24 (1): 147-52, 2001.