



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

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS E ANTITUMORAIS DO  
EXTRATO ETANÓLICO DE *Physalis angulata* L. EM CÉLULAS DE  
LINHAGEM TUMORAL C6 DE GLIOBLASTOMA**

Salvador, BA

2022

**BRENDA VALERIO SOUZA**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS E ANTITUMORAIS DO  
EXTRATO ETANÓLICO DE *Physalis angulata* L. EM CÉLULAS DE  
LINHAGEM TUMORAL C6 DE GLIOBLASTOMA**

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

Coorientador: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Silvia Lima Costa

Salvador, BA

2022

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA),  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S729 Souza, Brenda Valério  
Avaliação dos efeitos citotóxicos e antitumorais do extrato etanólico  
de  
Physalis Angulata L. em células de linhagem tumoral C6 de  
Glioblastoma/  
Brenda Valério Souza. – Salvador, 2022.  
63 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Moraes Pinheiro; Coorientadora:  
Profª. Drª. Silvia Lima Costa.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto de  
Ciências da Saúde/Programa de Pós-Graduação em Imunologia, 2022.

***Dedico***

*Aos meus pais, por todo  
apoio e amor.*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais *Ednaldo* e *Eldilana*, que foram minha fortaleza e me mantiveram de pé nos momentos difíceis, e torceram de todo coração pelo meu sucesso e felicidade. Amo vocês mais que tudo na vida!

À minha irmã *Kelly*, pelo companheirismo e troca de informações sobre o que é viver um mestrado em tempos de pandemia.

À minha família pelo apoio de sempre mesmo à distância. Em especial, aos meus amados avós, *Geraldo* (em memória), *Edna*, *Valdenora* (em memória) e *Justino*; minhas queridas tias que sempre vibraram pelas minhas conquistas; meus primos parceiros, amigos e confidentes.

À minha afilhada *Rafaela* por mostrar que amor de mãe pode ser sentido por quem não geramos.

Aos meus bons e velhos amigos pelos momentos de diversão que passamos juntos, agradeço por terem compreendido minhas ausências. Sem vocês tudo seria muito mais difícil.

Ao meu orientador *Alexandre Pinheiro* pela paciência de anos a fio em me ensinar, direcionar e corrigir quando necessário, desde quando eu estava na metade da graduação. Sou grata pelas oportunidades e portas que me abriu. Todo meu reconhecimento e admiração.

À minha grande amiga, parceira de laboratório e primeira orientadora, *Ana Elisa Del'Arco*, por sempre me estender a mão quando eu necessitei de ajuda. Sua amizade e carinho significam muito para mim.

Aos colegas do LabNq, pelas trocas vividas durante a execução da minha pesquisa, além dos valiosos conselhos e auxílio quando eu mais precisei: *Washington Antunes*, *Janaína Ribeiro*, *Balbino Lino*, *Itamara Raquel*, *Catarina de Jesus*, *Deivison Argolo*, *Jéssica Teles*, *Veronica Moreira*, *Lucas Oliveira* e *Erica Novaes*.

Aos docentes do LabNq, Prof. Dr. *Victor Diógenes*, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> *Silvia Costa*, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> *Maria de Fátima*, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> *Ravena Nascimento*, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> *Juciele Ribeiro*, e Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> *Clarissa Schitine*, por todo o apoio e exemplo.

Aos professores do PPGIm por terem encarado com maestria o desafio de transferir seus ensinamentos de maneira remota quando todos nós passamos por esse momento tão difícil em nossas vidas, que foi a pandemia de Covid-19.

Aos estimados colegas de pós-graduação, que juntos compartilhamos conhecimentos, dúvidas e momentos de descontração. Não poderia deixar de mencionar a querida *Jéssika*

*Amparo* (em memória), colega de laboratório que partiu precocemente deixando um vazio enorme no LabNq e em todos que puderam conhecê-la.

À Dr<sup>a</sup> *Angela Lima* e Prof. Dr. *Victor Diógenes* pelas importantes contribuições dadas na banca de qualificação para que meu trabalho fosse aperfeiçoado.

À CAPES pelo auxílio financeiro concedido para que esta pesquisa fosse possível.

À UFBA e à secretaria do PPGIm, em especial *Aline Luz*, que, sempre solícita, sanou minhas dúvidas e pendências acadêmicas.

Por fim, a todos que de alguma forma contribuíram para tornar meus dias mais felizes.

Obrigada!

*Não queremos perder, nem deveríamos perder: saúde, pessoas, posição, dignidade ou confiança. Mas perder e ganhar faz parte do nosso processo de humanização.*

(Lya Luft)

## RESUMO

Os glioblastomas são tumores cerebrais de células gliais de alto grau que apresentam um prognóstico ruim. Possuem grande capacidade de migração, proliferação e invasão ao tecido cerebral, o que reduz as chances de sucesso do tratamento. Novos alvos terapêuticos são estudados a fim de aumentar a eficácia dos tratamentos e diminuir efeitos colaterais. Análise e prospecção de metabólitos secundários de plantas são estudados surgindo como uma possibilidade no desenvolvimento de novas terapias. *Physalis angulata* L. é uma espécie vegetal rica em componentes químicos e promissora para a indústria farmacêutica. Possui dentre muitos benefícios comprovados, a ação antitumoral e citotóxica. O objetivo deste trabalho foi estudar a ação do extrato etanólico de *Physalis angulata* L. (EEPA) em células de linhagem tumoral C6 de glioblastoma murino. Como metodologia, a citotoxicidade foi avaliada por MTT. O óxido nítrico foi dosado pelo método de Griess. A migração celular foi analisada a partir do ensaio de migração. A morfologia celular foi avaliada por imunocitoquímica com imunomarcagem de EGFR e método de coloração Rosenfeld. A expressão de proteínas foi avaliada pelo método *western blotting*. A capacidade de restauração tecidual foi analisada pelo ensaio de migração celular. Os resultados foram analisados pelo programa estatístico *Graphpad Prism 8.10* e os dados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média dos parâmetros analisados. Como resultados, notou-se através do ensaio de MTT, que o EEPA foi citotóxico acima da concentração 5  $\mu\text{g/mL}$ , sendo então escolhidas as concentrações 0,5  $\mu\text{g/mL}$ , 1  $\mu\text{g/mL}$  e 2,5  $\mu\text{g/mL}$  para modulação dos experimentos seguintes. Na análise da expressão do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) por imunocitoquímica, houve a diminuição da expressão do EGFR nas concentrações 1  $\mu\text{g/mL}$  e 2,5  $\mu\text{g/mL}$ . Já no Rosenfeld, nas concentrações 1  $\mu\text{g/mL}$  e 2,5  $\mu\text{g/mL}$  tivemos uma quantidade menor de células e presença de prolongamentos menores e mais finos, e corpo celular menor quando comparado aos controles. O *western blotting* demonstrou uma menor expressão do EGFR nas concentrações testadas quando comparado ao controle. O ensaio de migração demonstrou capacidade inibitória do composto na migração celular. Os resultados obtidos neste estudo podem indicar capacidade citotóxica, redução da expressão e da capacidade migratória das células C6 quando moduladas com o EEPA.

**Palavras-chave:** Tumores. Glioblastoma. *Physalis angulata*. Extrato de plantas.

## ABSTRACT

Glioblastomas are high grade glial cell brain tumors that have a poor prognosis. They have a great capacity for migration, proliferation and invasion into brain tissue, which reduces the chances of treatment success. New therapeutic targets are studied in order to increase the efficacy of treatments and decrease side effects. Analysis and prospection of plant secondary metabolites are being studied as a possibility in the development of new therapies. *Physalis angulata* L. is a plant species rich in chemical components and promising for the pharmaceutical industry. It has, among many proven benefits, the antitumor and cytotoxic action. The objective of this work is to study the action of *P. angulata* L. ethanolic extract (EEPA) on murine glioblastoma C6 tumor cells. As a methodology, cytotoxicity was evaluated by MTT. Nitric oxide was dosed by Griess method. Cell migration was analyzed from migration assay. Cell morphology was evaluated by immunocytochemistry with EGFR immunolabeling and Rosenfeld staining method. Protein expression was evaluated by Western blotting method. Cell migration was analyzed by cell migration assay. The results were analyzed by Graphpad Prism 8.10 statistical program and the data were expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean of the analyzed parameters. As results, it was noted through MTT assay, that EEPA was cytotoxic above the concentration 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , being then chosen the concentrations 0.5, 1 and 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for modulation of the following experiments. In the analysis of EGFR expression by immunocytochemistry, there was a decrease in EGFR expression at concentrations 1 and 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . In the Rosenfeld test, at concentrations 1 and 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  we had fewer cells and the presence of smaller and thinner prolongations, and a smaller cell body when compared to controls. Western blotting demonstrated a lower expression of EGFR at the concentrations tested when compared to the control. The migration assay demonstrated inhibitory capacity of the compound on cell migration. The results obtained in this study may indicate cytotoxic capacity, reduced expression and migratory capacity of C6 cells when modulated with EEPA.

**Keywords:** Tumors. Glioblastoma. *Physalis angulata*. Plant extract.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Os principais tipos de células do SNC englobam as células neuronais (neurônio) e as células da glia (astrócitos, microglias, oligodendrócitos e células NG2). 19
- Figura 2.** Componentes celulares do microambiente tumoral. Adaptada de Hanahan & Weinberg (2011). 22
- Figura 3.** Fotomicrografia das linhagens celulares C6 sob condições padrão. SALEH et al (1996). 26
- Figura 4.** (A) Aspecto visual do ramo da planta; (B) Aspecto visual dos frutos; (C) Aspecto visual da flor. 27
- Figura 5.** Estrutura básica das fisalinas (FREITAS, 2019) 28
- Figura 6.** Análise do efeito do EEPA no metabolismo de células C6 verificadas através do teste de MTT. A significância estatística foi obtida utilizando o teste One way ANOVA seguido do pós-teste Dunn's, com (\*) representando a diferença estatística entre o grupo controle e os demais grupos tratamento, com valor de  $p < 0,05$ , (\*\*\*)  $p < 0,001$  e (\*\*\*\*)  $p < 0,0001$ . 36
- Figura 7.** Análise do efeito do EEPA no metabolismo de células C6 verificadas através do teste de MTT nas concentrações determinadas. A significância estatística foi obtida utilizando o teste One way ANOVA para dados paramétricos, seguido do pós-teste Dunn's, com (\*) representando a diferença estatística entre o grupo controle e os demais grupos tratamento, com valor de \*  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,001$  e (\*\*\*\*)  $p < 0,0001$ . 37
- Figura 8.** Dosagem de nitrito em culturas de células C6 em culturas controle e DMSO, e as tratadas com EEPA nas concentrações de  $0,5\mu\text{g/mL}$ ,  $1\mu\text{g/mL}$  e  $2,5\mu\text{g/mL}$  por 24h. Os dados são apresentados em média  $\pm$  DP. A significância estatística foi obtida utilizando o teste One way ANOVA para dados paramétricos e Kruskal Wallis para dados não paramétricos, seguido do pós-teste Dunn's. Com (\*) representando a diferença estatística entre o grupo controle e os demais grupos tratamento, com valor de \*  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,001$ , e (#) representando a diferença estatística entre o grupo DMSO e os demais tratamentos. 38

**Figura 9.** Análise da morfologia de C6 por método imunocitoquímico. Cultura de células C6 tratadas com EEPA (0,5 µg/mL, 1 µg/mL e 2,5 µg/mL) num período de 24 horas. Marcação imunocitoquímica para EGFR (em verde) e DAPI (em azul). A - Condição controle (DMEM); B - Controle com DMSO 0,1 µg/mL; C - Tratamento com 0,5 µg/mL de EEPA; D - Tratamento com 1 µg/mL de EEPA; E - Tratamento com 2,5 µg/mL de EEPA. 39

**Figura 10.** Análise da morfologia de C6 por método Rosenfeld. Culturas de células C6 tratadas com EEPA (0,5 µg/mL, 1 µg/mL e 2,5 µg/mL) num período de 24 horas. Coloração Rosenfeld. A - Condição controle (DMEM); B - Controle com DMSO 0,1 µg/mL; C - Tratamento com 0,5 µg/mL de EEPA; D - Tratamento com 1 µg/mL de EEPA; E - Tratamento com 2,5 µg/mL de EEPA. 40

**Figura 11.** Efeito dos controles (DMEM e DMSO) na cultura de células C6 sobre a migração celular, avaliados após 0, 24 e 48 horas de experimento. Efeito das concentrações 0,5 µg/mL, 1 µg/mL e 2,5 µg/mL na cultura de células C6 sobre a migração celular, avaliados após 0, 24 e 48 horas de experimento. Culturas com 48 horas de migração celular foram coradas pelo corante de Rosenfeld 41

**Figura 12.** Representação gráfica da área de lesão em mm referente ao comprimento entre as bordas do tapete celular de C6. A área foi medida manualmente no software ImageJ. 42

**Figura 13.** Expressão de EGFR por western blotting. Bandas imunorreativas ao EGFR em grupo controle, DMSO e concentrações 0,5 µg/mL, 1 µg/mL e 2,5 µg/mL. 43

**Figura 14.** Gráfico da expressão da proteína EGFR nas concentrações controle, DMSO, 0,5 µg/mL, 1 µg/mL e 2,5 µg/mL. Para avaliar a normalidade, foi utilizado o teste Shapiro-Wilk. A significância estatística foi obtida utilizando o teste One way ANOVA para dados paramétricos e Kruskal Wallis para dados não paramétricos, seguido do pós-teste Dunn's. Com (\*) representando a diferença estatística entre os grupos controle e os demais grupos tratamento, com valor de \*  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,001$ . 43

## LISTA DE ABREVIATURAS

BHE	Barreira hemato-encefálica
bCSC	células-tronco cancerígenas cerebrais ( <i>brain Cancer Stem-like Cells</i> )
C6	Linhagem de glioblastoma murino C6
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CSF-1	Fator de estimulação de colônias 1
DAPI	4', 6-diamidino-2-fenilindol dihidrocloro
DMEM	Meio de Eagle Modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EEPA	Extrato etanólico de <i>Physalis angulata</i>
EGFR	Fator de crescimento epitelial ( <i>Epithelial Growth Factor Receptor</i> )
EGFR <sup>vIII</sup>	Variante 3 do fator de crescimento epitelial
ELISA	Ensaio de imunoadsorção ligada à enzima
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto ( <i>Fibroblast Growth Factor</i> )
GL-15	Linhagem de células de glioblastoma multiforme humano
IFN- $\gamma$	Interferon Gama
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LPS	Lipopolissacarídeo
MMP	Metaloproteinases de matriz
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade

MTT	3-(4-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolio
NO	Óxido nítrico
NSC	Células-tronco neurais ( <i>Neural Stem Cells</i> )
PBS	Tampão fosfato salino
PGE2	Prostaglandinas E2
PVDF	Membrana de fluoreto polivinilideno para transferência
SDS	Duodecil sulfato de sódio
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SFB	Soro fetal bovino
T CD4	Células T auxiliares tipo CD4
TBS	Tampão tris salino
TBS-T	Tampão tris salino com Tween 20X
TGF-2	fator de crescimento transformador Beta
TNF	fator de necrose tumoral
TH1	Resposta de células T auxiliares tipo 1
TH2	Resposta de células T auxiliares tipo 2
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular ( <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> )
VEGFR	Fator de crescimento endotelial vascular ( <i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i> )

## LISTA DE UNIDADES DE MEDIDA

°C    graus Celsius

μL    microlitros

μM    micromolar

mm    milímetros

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>19</b>
2.1 Introdução ao Sistema Nervoso e composição celular .....	19
2.2.1 O sistema imune X microambiente tumoral .....	22
2.2.2 Linhagem celular C6 derivada de glioblastoma .....	24
2.3 <i>Physalis angulata</i> L. ....	26
2.3.1 Principais componentes farmacológicos presentes na <i>P. angulata</i> .....	27
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>30</b>
3.1 Objetivo geral .....	30
3.2 Objetivos específicos .....	30
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>31</b>
4.1 Extrato Etanólico de <i>Physalis angulata</i> .....	31
4.2 Análise química do extrato etanólico bruto de <i>Physalis angulata</i> .....	31
4.3.1 Cultura de células C6 de glioblastoma .....	32
4.4 Ensaios .....	32
4.4.1 Citotoxicidade avaliada por MTT.....	32
4.4.2 Dosagem de Óxido Nítrico (NO).....	32
4.4.3 Coloração Rosenfeld.....	33
4.4.4 Ensaio de migração das células C6 moduladas com EEPA .....	33
4.4.5 Análise imunocitoquímica da expressão da proteína EGFR .....	34
4.4.6 Western Blotting .....	34

4.5 Análise estatística .....	35
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>36</b>
5.1 Efeito do EEPA sobre o metabolismo celular .....	36
5.2 Alterações morfológicas e de expressão de EGFR.....	37
5.3 Mensuração do NO .....	38
5.4 Efeitos migratórios das células C6 .....	40
5.5 Expressão da proteína EGFR por Western blotting.....	42
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>44</b>
<b>7 CONCLUSÃO GERAL .....</b>	<b>50</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>51</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>52</b>



## 1 INTRODUÇÃO

Neoplasia é definida como uma proliferação de células anormais no tecido, de forma descontrolada e autônoma, podendo ser classificada como benigna ou maligna. A neoplasia benigna forma um agregado de células tornando uma massa única, enquanto que na neoplasia maligna as células possuem alta capacidade infiltrativa nos tecidos adjacentes (INCA, 2011).

Sabe-se que a incidência de neoplasias aumenta de acordo com o avanço da idade e pode ser explicada pelo acúmulo de mutações somáticas associadas à redução da imunocompetência que acompanha o envelhecimento (PINTO & CHIMELLI, 2004). De acordo com Badke *et al.* (2014), o aumento desta incidência pode ser explicada pelo aumento da notificação e investigação da doença, bem como o aumento populacional, pela maior expectativa de vida da população e o aumento da exposição à carcinógenos, em específico à radiação eletromagnética ionizante e não ionizante.

Os gliomas englobam um grupo diversificado de tumores intrínsecos do sistema nervoso central (SNC), e representam 30% a 40% de todos os tumores intracranianos. Cerca de 50% desses tumores são representados por glioblastomas multiformes, o tipo mais agressivo do tumor (SCHNEIDER *et al.*, 2010).

O glioblastoma multiforme, bem como a maioria dos tumores malignos, suprimem a resposta imunológica antitumoral, e secretam citocinas imunossupressoras a fim de tornar o ambiente favorável ao seu crescimento e disseminação no SNC. Além disso, possuem a capacidade de formar neovasos para suprir necessidades metabólicas, resistem a estímulos apoptóticos, performam alta proliferação celular e capacidade de invasão de tecidos (LU; SHERVINGTON, 2008; KUMAR *et al.*, 2006; COELHO *et al.*, 2016).

As intervenções terapêuticas aplicadas aos glioblastomas consistem em quimioterapia, ressecção cirúrgica e radioterapia, isoladamente ou combinados. A eficácia terapêutica é limitada, pois se trata de um tumor de alta recidiva, reflexo da alta propriedade infiltrativa. O risco de uma ressecção total causar ao paciente danos neurológicos permanentes é alta (SOFFIETTI *et al.*, 2007).

Diante da escassez de intervenções terapêuticas realmente eficazes para tratamento de doenças de cunho neurológico em geral, a análise e prospecção de metabólitos secundários vegetais surge como possibilidade de desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos (BUSCH *et al.*, 2015).

*Physalis angulata* L. é uma espécie alvo de diversos estudos químicos e farmacológicos, e muito utilizada na medicina popular de diversos países. Tem ocupado uma posição de

destaque para prospecção de compostos medicinais devido a sua riqueza de componentes químicos, sendo uma das espécies mais promissoras para a indústria farmacêutica (TOMASSINI *et al.*, 2000).

Extratos preparados a partir das raízes de *P. angulata* demonstraram potentes atividades antiinflamatórias/imunomoduladoras (SOARES *et al.*, 2003) e antineoplásicas (CHIANG *et al.*, 1992). As propriedades farmacológicas da *P. angulata* são atribuídas, em grande parte, às fisalinas, que exercem atividades antiparasitárias, antivirais, antineoplásicas, entre muitas outras (TOMASSINI *et al.*, 2000). Já foram isoladas de raiz, caule e folhas as fisalinas B, G, D, E, F, H, I, K e U (HE *et al.*, 2007; DAMU *et al.*, 2007).

O presente estudo investigou a atividade do extrato etanólico do caule de *Physalis angulata* (EEPA) em culturas de células de glioblastoma murino. Pesquisas com o uso do EEPA em células C6 é inédito, portanto, buscamos contribuir com o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas no tratamento dos glioblastomas.

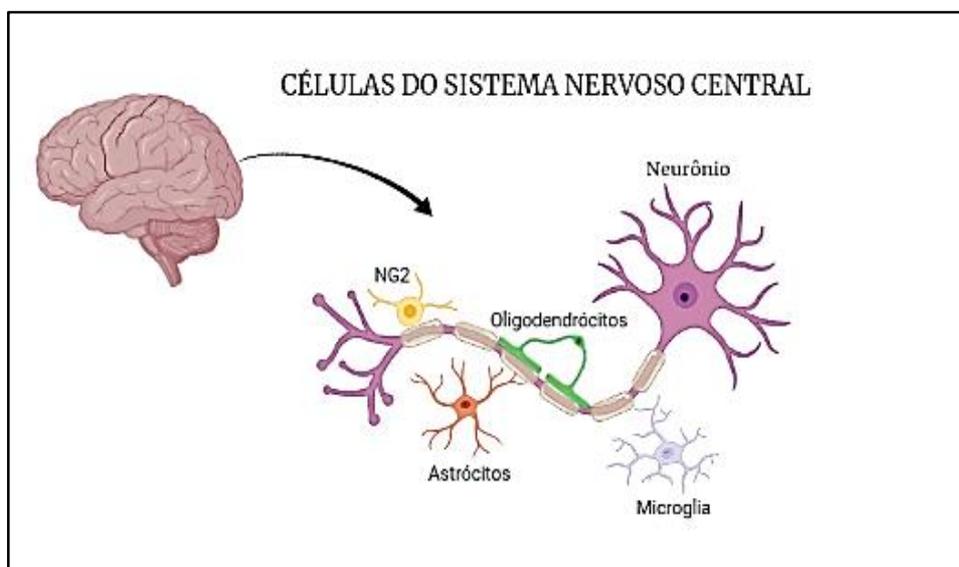
## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 INTRODUÇÃO AO SISTEMA NERVOSO E COMPOSIÇÃO CELULAR

O sistema nervoso é um sistema de órgãos sofisticados e complexos. Possui duas divisões: o sistema nervoso central (SNC) e o sistema nervoso periférico (SNP). O SNC é formado pelo encéfalo (cérebro, cerebelo e tronco encefálico) e medula espinhal, já o SNP é formado por nervos e células nervosas que ficam situadas fora do encéfalo e medula espinhal (BEAR *et al.*, 2017).

O sistema nervoso central (SNC) apresenta a maior diversidade celular dos organismos vivos. Possui uma estrutura bilateral simétrica dividida em sete partes principais: medula espinhal, medula oblonga, ponte, cerebelo, mesencéfalo, diencéfalo e hemisférios cerebrais. O SNC contém uma extensa rede vascular na qual residem células mieloides circulantes, como monócitos, granulócitos e células dendríticas (GOMES *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2017; KANDEL, 2014).

Tanto no SNC como no SNP, os neurônios possuem uma inter-relação com as células da glia, também chamada de neuróglia. A neuróglia abrange células astrocíticas, oligodendrócitos, células ependimárias, células NG2 e a microglia. Há alguns anos, acreditava-se que a proporção de neurônios era menor que da neuróglia. Sabe-se que o número de neurônios e células gliais são similares, sendo cerca de 86 bilhões de neurônios e 85 bilhões de células gliais (HERCULANO-HOUZEL, 2014; MACHADO & HAERTEL, 2014; PAUKERT & BERGLES, 2006) (Figura 1).



**Figura 1.** Os principais tipos de células do SNC englobam as células neuronais (neurônio) e as células da glia (astrócitos, microglia, oligodendrócitos e células NG2). Autoria: Brenda Valerio

Dentre a neurógliia, os astrócitos, oligodendrócitos e células NG2 integram a chamada macroglia, que possuem origem ectodermal, e a microglia de origem mesodermal. Tanto a macroglia quanto a microglia estão dispostas entre os neurônios (MACHADO & HAERTEL, 2014; RANSOM & KETTENMANN, 1990).

O neurônio, unidade fundamental do SNC, possui a função basicamente de captar, processar e enviar diversas informações a partir de impulsos elétricos, ou seja, modificações no potencial de membrana. São células altamente excitáveis que se comunicam com outras células efectoras. Morfologicamente, são formados por uma soma, dendritos e o axônio (MACHADO & HAERTEL, 2014; BEAR *et al.*, 2017).

A comunicação entre um neurônio e outro é realizada por meio de uma transmissão sináptica, onde a informação é repassada na forma de impulsos elétricos ao longo do axônio, e transformada em sinal químico, também chamado de neurotransmissor. Já a capacidade de desempenhar funções, como realizar um movimento, ter uma sensação, memória ou um pensamento, são realizados a partir de um conjunto chamado circuitos neuronais. Estes circuitos envolvem neurônios em diferentes locais, mas que quando ativados irão promover alguma função (BEAR, 2017; LENT, 2010).

Os astrócitos são assim chamados por possuírem morfologia estrelada. São as células mais abundantes dentre a neurógliia, constituindo cerca de 85-90% do total celular. Tem funções de sustentação, isolamento neuronal, bem como importância para a função neuronal, onde participam do controle nos níveis de potássio, recaptação de neurotransmissores e armazenamento de glicogênio. Essas células também fazem parte da constituição da barreira hemato encefálica (BHE) (HE & SUN, 2007; MACHADO & HAERTEL, 2014; ZHOU *et al.*, 2019).

Os oligodendrócitos, por sua vez, possuem poucos prolongamentos e são responsáveis pela produção e manutenção da bainha de mielina nos axônios do SNC, essenciais para a rápida condução dos sinais elétricos no SN. Já as células NG2 atuam como células-tronco no encéfalo, podendo se diferenciar tanto em neurógliia quanto em neurônios (MACHADO & HAERTEL, 2014; CAI *et al.*, 2005; KREBS *et al.* 2013).

As microglias são a população macrofágica residente do SNC e principais células imunes nervosas, extensivamente estudada até os dias atuais por ser uma das principais responsáveis pela manutenção da homeostase cerebral, formando uma rede que abrange todo o SNC (GINHOUX *et al.*, 2010; EL KHOURY, 2010; LAWSON *et al.*, 1990).

## 2.2 Gliomas

Os cânceres do SNC representam de 1,4 a 1,8% de todos os tumores malignos no mundo. No Brasil, os tumores do SNC ocupam o 8º lugar em termos de frequência (INCA, 2017), e no ano de 2020 no Brasil, ocorreram 11.090 novos casos, sendo 5.870 em homens e 5.220 em mulheres (INCA, 2020).

A incidência de neoplasias do SNC no Brasil no ano de 2014 no sexo feminino foi de 4,05 novos casos por 100 mil habitantes, correspondente a 1,5% de todas as neoplasias ocorridas deste ano. Já a incidência para indivíduos do sexo masculino é um pouco maior, cerca de 5,7 novos casos por 100 mil habitantes, o que corresponde a 1,6% do total de neoplasias para o ano de 2014 (INCA, 2014).

Glioma é uma nomenclatura geral utilizada para descrever tumores cerebrais primários de células gliais. São classificados em grau de I a IV de acordo com o nível de malignidade. O astrocitoma grau IV ou glioblastoma multiforme é o tipo mais agressivo do tumor, altamente vascularizado, de crescimento rápido e bastante invasivo (HOLLAND, 2000; JOVCEVSKA *et al.*, 2013; LOUIS *et al.*, 2007; VANDENBERG, 1992).

O glioblastoma multiforme mata cerca de 225 mil pessoas ao ano, e representa mais de 60% dos tumores cerebrais em adultos. O prognóstico para este tipo de tumor é uma sobrevida de aproximadamente 14-15 meses após o diagnóstico (HANIF *et al.*, 2017). De acordo com Hanif *et al.* (2017), os gliomas são a neoplasia mais comum relacionada ao SNC, constituindo cerca de 80% de todas as malignidades cerebrais. Os gliomas malignos são os responsáveis por 2,5% das mortes por câncer e são a terceira principal *causa mortis* por câncer em pessoas na faixa etária de 15 a 34 anos de idade (SALCMAN, 1990).

O que leva ao desenvolvimento de um glioma é um assunto controverso, no entanto existem diversos fatores que contribuem para o seu surgimento no SNC, sendo as principais causas: anormalidades e/ou ausência de controle da divisão celular, mutações genéticas e altas doses de irradiação (SCHWARTZBAUM *et al.*, 2006; OZEKI *et al.*, 2010).

Os glioblastomas são tumores com alta capacidade migratória, invasiva e proliferativa no tecido saudável, o que prejudica muito no estabelecimento de protocolos terapêuticos. Essas características são atribuídas ao microambiente pró-inflamatório circulante, que é composto por fatores de crescimento e mediadores inflamatórios, liberados pelas células tumorais. A secreção de moléculas pró-inflamatórias, fatores de crescimento, óxido nítrico (NO), espécies reativas de oxigênio (EROS) e metaloproteinases de matriz (MMP) são exemplos de moléculas sintetizadas e secretadas pelas células de defesa, assim como pelas células tumorais, que

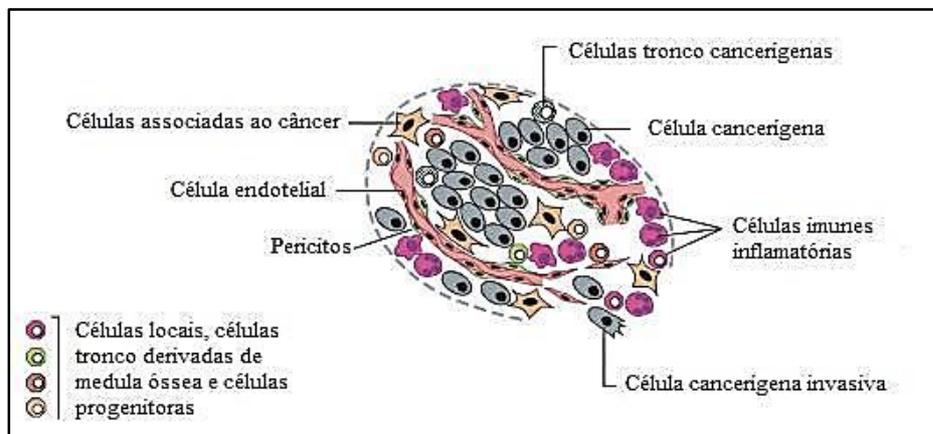
participam da composição bioquímica e pró-inflamatória no microambiente tumoral (ANJUM *et al.*, 2017; AGARWALA & KIRKWOOD, 2000; YANG *et al.*, 2010).

A abordagem terapêutica para os glioblastomas, assim como para outros tipos de tumores cerebrais, é multidisciplinar. Novos agentes terapêuticos têm sido sugeridos e pesquisados com o objetivo de aumentar a eficácia dos tratamentos convencionais e diminuir os possíveis efeitos colaterais. A ressecção cirúrgica para os glioblastomas é limitada devido ao tumor se localizar em regiões vitais do corpo. Além disso, a alta propriedade infiltrante facilita a sua maior recorrência, impossibilitando a retirada cirúrgica de todo o tumor (HILDEBRAND *et al.*, 1997; VANDIER *et al.*, 1998; SOFFIETTI, *et al.*, 2007).

Um grande empecilho no tratamento dos glioblastomas é a incapacidade de muitos quimioterápicos atravessarem a barreira hematoencefálica, em função da sua atuação em proteger o cérebro de substâncias químicas presentes no sangue, regulando a passagem de moléculas a fim de manter a homeostase cerebral (NATSUME & YOSHIDA, 2008; LENT, 2010).

### 2.2.1 O sistema imune X microambiente tumoral

No desenvolvimento de um câncer, existe um processo microevolucionário onde uma célula maligna possui a capacidade de reprogramar seu metabolismo para alimentar o rápido crescimento e trocar sinais moleculares com a microbiota local para evadir da resposta imune do hospedeiro, criando assim um chamado “microambiente do tumor”. A comunicação realizada entre as células saudáveis e as células tumorais é fundamental para o estabelecimento do microambiente tumoral (Figura 2) (HANAHAN & WEINBERG, 2011; SPANOA *et al.*, 2012; ZHENG *et al.*, 2018).



**Figura 2.** Componentes celulares do microambiente tumoral. Adaptada de HANAHAN; WEINBERG (2011).

A resposta imune presente no microambiente tumoral é considerada dinâmica e heterogênea. A imunovigilância do câncer foi primeiramente proposta por Macfarlane Burnet

nos anos de 1950 e é bem estabelecida atualmente. Dispõe que existe uma função fisiológica do sistema imune em reconhecer e debelar clones de células transformadas antes que se desenvolvam em tumores, e também são capazes de eliminar tumores mesmo depois de formados. Porém esta reatividade imune pode ser prejudicada por inúmeros motivos, fazendo com que as células tumorais escapem da destruição (ABBAS *et al.*, 2019; MANTOVANI *et al.*, 2008).

As respostas imunes frequentemente falham na prevenção do crescimento de tumores, o que se dá a partir do desenvolvimento de mecanismos especializados em evadir as respostas imunes do hospedeiro. Esses mecanismos resultam na redução do reconhecimento da célula maligna ou na resistência aos efeitos citotóxicos do sistema imune (SCHREIBER *et al.*, 2011).

A evasão ao sistema imune pode acontecer por diversos mecanismos, como regulação negativa da expressão das moléculas do MHC, crescimento de células que não expressam antígenos tumorais, produção de substâncias imunossupressoras solúveis, engajamento de receptores de inibição em linfócitos por seus ligantes que são expressos em células tumorais e indução de células T reguladoras (ABBAS *et al.*, 2019).

Pacientes portadores do glioblastoma são sistemicamente imunossuprimidos (MAHALEY *et al.*, 1977; DIX *et al.*, 1999) a partir de fatores secretados pelo tumor, como TGF-2 (fator de crescimento transformador 2) e PGE2 (prostaglandina E2), que têm como objetivo tornar o ambiente favorável ao crescimento e disseminação do tumor no SNC. Estes fatores possuem múltiplos efeitos imunossupressores, sendo a supressão da proliferação linfocitária a mais marcante, afetando a contagem de linfócitos T CD4, tornando-a reduzida, além de suprimir as funções das células T (GUSTAFSON *et al.*, 2010; SIEPL *et al.*, 1988; KUPPNER *et al.*, 1989; FONTANA *et al.*, 1982; SAWAMURA *et al.*, 1990; KUMAR, 2006; COELHO *et al.*, 2016).

O sistema imunológico não somente protege o hospedeiro contra a formação de tumores, mas também é capaz de modular um tumor já estabelecido, selecionando variantes com imunogenicidade reduzida, além de promover o crescimento tumoral via inflamação crônica persistente. A presença da inflamação crônica mantém um microambiente pró-tumoral que pode contribuir na progressão, sobrevivência, angiogênese, invasão e metástase do tumor (FELLER *et al.*, 2013).

Além do papel do sistema imunológico na erradicação tumoral, existe também a contribuição para o crescimento de alguns tumores sólidos. O sistema imune inato pode ser diretamente associado ao desenvolvimento de um tumor, como visto na ativação crônica de

células imunes inatas que irão desencadear angiogênese e remodelamento dos tecidos, o que favorece o crescimento e disseminação tumoral (ABBAS *et al.*, 2019).

Além dos fatores imunossupressores, os glioblastomas também secretam fatores imunomoduladores, como IL-6 (interleucina 6) e CSF-1 (fator de estimulação de colônias 1) com importantes funções imunitárias de mudança da imunidade adaptativa para respostas humorais (T Helper 2) que são menos eficazes contra tumores sólidos (PARNEY *et al.*, 2011; HAO *et al.*, 2002; BENDER *et al.*, 2010).

A produção de citocinas e quimiocinas inflamatórias, como a IL-1, IL-6 e IL-8 estão relacionadas ao efeito paradoxal da inflamação no crescimento dos tumores. Esses mediadores recrutam neutrófilos e macrófagos que produzem outras citocinas que estimulam a proliferação do tumor, bem como a angiogênese necessária para a rápida proliferação celular (ROITT & DELVES, 2013).

Os tumores estimulam respostas imunes adaptativas específicas que podem prevenir ou limitar o crescimento e disseminação tumoral. Essas respostas imunes adaptativas são induzidas e reguladas por células dendríticas, sendo estas fundamentais no reconhecimento e captação de antígenos no local do tumor primário, que dará início a migração para os linfonodos e maturação (ABBAS *et al.*, 2019; PALUCKA; BANCHEREAU, 2012; COLLIN *et al.*, 2013).

Zhang *et al.* (2008) demonstraram que pacientes com glioblastoma possuíam diminuição de células dendríticas imaturas, o que sugere defeitos na capacidade de apresentação de antígenos. A complexidade celular atribuída aos tumores gliais de alto grau é resultado do recrutamento de células não gliais no microambiente tumoral, o que contribui para a complexidade da estrutura-alvo oncológica (WESTPHAL; LAMSZUS, 2017).

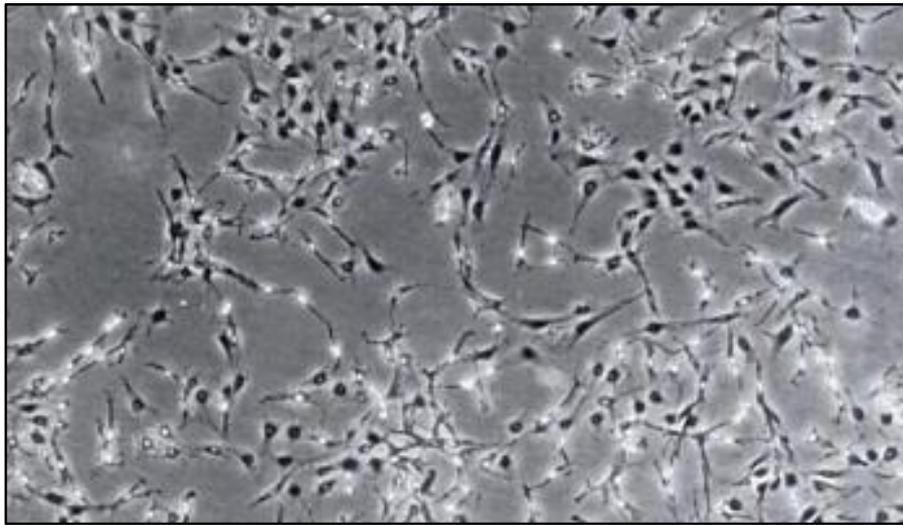
### **2.2.2 Linhagem celular C6 derivada de glioblastoma**

As linhagens celulares representam uma alternativa útil para o estudo de causas e tratamentos de uma variedade de doenças de cunho neurológico. Linhagens celulares como a GL-15, U251 de glioblastoma humano e a C6 de glioma murino permitem o estudo *in vitro* de viabilidade celular e mecanismos de ação moleculares, configurando uma importante ferramenta na prospecção de novos fármacos (CASTIGLI *et al.*, 2006; GREENE & TISCHLER, 1976).

Benda *et al.* (1968) estabeleceu a linhagem C6 através da administração repetitiva de metilnitrosourea (MNU) em ratos Wistar adultos. O modelo C6 de glioma de rato é um dos modelos experimentais mais utilizados na pesquisa neuro-oncológica para avaliar o

crescimento e invasão dos gliomas de alto grau, bem como analisar as características do glioma tais como desenvolvimento, migração e angiogênese (BING *et al.*, 1990; GIAKOUMETTIS *et al.*, 2018).

A linhagem C6 apresenta morfologia astrocítica e é bastante utilizada em experimentos de Neurobiologia (Figura 3). Tem sido muito utilizada para estabelecer um modelo que simula o glioblastoma humano, pois possuem fenótipo semelhante ao do glioblastoma multiforme humano (COHEN *et al.*, 1990; GIERYNG *et al.*, 2017; GROBBEN *et al.*, 2002).



**Figura 3.** Fotomicrografia das linhagens celulares C6 sob condições padrão. Fonte: SALEH *et al.* (1996).

O padrão de evasão imunológica visto no glioblastoma multiforme humano possui genes relacionados com a invasão e imunossupressão gerada nos gliomas de células C6. Sendo, portanto, o modelo de glioma C6 considerado um bom modelo de hospedeiro imunocompetente para estudos *in vivo* e é amplamente utilizado em estudos que investigam o crescimento e invasão tumoral, bem como a eficácia dos medicamentos antitumorais (GIERYNG *et al.*, 2017).

O modelo de glioma C6 apresenta uma diversidade de proteínas, fatores de crescimento e seus receptores expressos que constituem alvos para a investigação tumoral. Dentre os marcadores moleculares mais comumente estudados para glioblastomas, temos o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) (STOCKHAUSEN *et al.*, 2014).

O EGFR é uma glicoproteína transmembrana e membro do receptor da superfamília tirosina quinase, e são expressos em altos níveis em vários tipos de cânceres. Alterações em genes do EGFR foram identificados em gliomas, especialmente em glioblastomas. O EGFR possui função na regulação de migração e diferenciação de células-tronco neurais (NSC),

sendo encontrado expresso em áreas neurogênicas (GULLICK, 1991; SAADEH *et al.*, 2018; STOCKHAUSEN *et al.*, 2014).

Fatores angiogênicos, tais como o VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) e bFGF (fator de crescimento fibroblástico básico) participam do crescimento tumoral através dos receptores de tirosina cinase e MMPs, temos seus receptores, respectivamente, como o VEGFR (receptor do fator de crescimento vascular endotelial) e FGFR (receptor do fator de crescimento fibroblástico) (AUGUSTE *et al.* 2001; KIRSCH *et al.* 1998; MILLAUER *et al.* 1994; TAMAKI *et al.* 1998).

Para tanto, a maior parte das investigações acerca do glioma por C6 têm sido centradas em testar uma diversidade de agentes com atividades tumorícidas (GIAKOURMETTIS *et al.* 2018).

### 2.3 PHYSALIS ANGULATA L.

*P. angulata* é uma planta nativa da Amazônia e região andina, podendo ser encontrada em todo o território brasileiro, com maior incidência na região Norte e Nordeste. Pode receber várias denominações populares a depender da região, como “camapu”, “balãozinho”, “joá-de-capote” ou “camambu”. Pertencente à família *Solanaceae* e distribuída em todo o mundo, conta com cerca de 96 gêneros e 2.3000 espécies conhecidas (BRANCH & SILVA, 1983; HUNZIKER, 2001; MUNIZ *et al.* 2011).

A espécie *P. angulata* é utilizada na medicina popular de diversos países, principalmente da América do Sul, e ao longo dos anos vêm sendo alvo de muitos estudos por conterem substâncias de alto valor farmacológico, como flavonoides e esteroides em suas folhas, frutos, caule, cálices e raízes (CHAVES *et al.*, 2005; MOSCHETTO, 2005; SILVA & AGRA, 2005; TOMASSINI *et al.*, 2000; MIER-GIRALDO *et al.*, 2017).

As espécies do gênero *Physalis* possuem importantes atribuições econômicas e etnofarmacológicas, sendo utilizadas para diversas finalidades, como ação antiinflamatória, antitumoral, antimicrobiana, imunomodulatória, antioxidante, sedativa, analgésica, diurética, antiasmática, hipotensora, antiviral, tuberculostática, moluscicida, antitripanossomicida, leishmanicida e antimalárica (AGRA *et al.*, 2007; ALMEIDA, 1993; ARANGO *et al.*, 2010; GUIMARÃES *et al.* 2009; LOPES *et al.*, 2006; TOMASSINI *et al.*, 2000; WU *et al.*, 2005; WU *et al.*, 2006).

A *P. angulata* é uma erva de aproximadamente 50 cm de altura, com caracteres herbáceos e de hábito perene, e possui como característica marcante o fruto estar encerrado em um cálice (Figura 4) (SILVA & AGRA, 2005; TOMASSINI *et al.*, 2000).



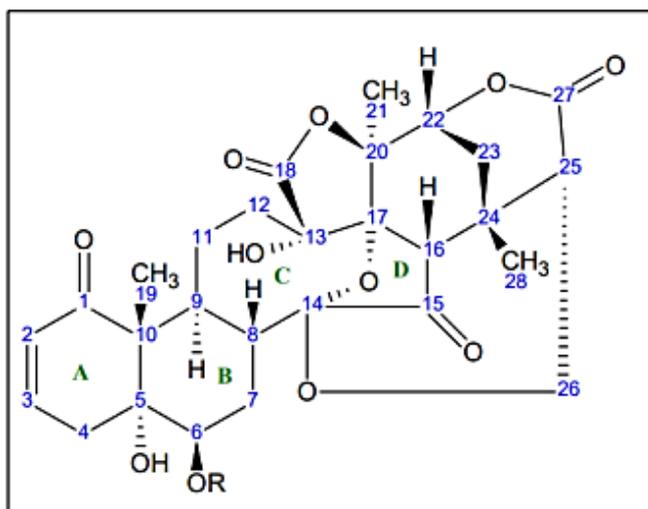
**Figura 4.** (A) Aspecto visual do ramo da planta; (B) Aspecto visual dos frutos; (C) Aspecto visual da flor. Fonte: Compilação da autora. Montagem a partir de imagens coletadas nos sites Natureza Bela, Flickr e Globo.

### 2.3.1 Principais componentes farmacológicos presentes na *P. angulata*

Já foram isolados flavonóides (campferol, quercetina e rutina), alcalóides, ácido ascórbico, carotenoides e alguns tipos de esteroides dessa planta. O principal grupo de esteroides encontrados são as fisalinas, presentes nas raízes e folhas. O potencial farmacológico das fisalinas são decorrentes da semelhança química com os glicocorticoides, o que confere a essa substância diversas funções (LOPES *et al.*, 2006; SOARES *et al.*, 2003; TOMASSINI *et al.*, 2000).

Quimicamente, as fisalinas são denominadas lactonas sesquiterpênicas esteroidais e possuem moléculas de estruturas bastante complexas (Figura 5). Por se tratarem de metabólitos secundários, as fisalinas são pouco abundantes, o que representa menos de 1% do carbono total das plantas (FUMAGALI *et al.*, 2008; TOMASSINI *et al.*, 2000).

A atividade antitumoral das fisalinas é alvo de pesquisas e especulações. Taylor (2006) relatou em suas pesquisas a forte atividade citotóxica *in vivo* e *in vitro* das fisalinas em diversos tipos de células cancerígenas (TOMASSINI *et al.*, 2000).



**Figura 5.** Estrutura básica das fisalinas. Fonte: FREITAS (2019).

A atividade antineoplásica da fisalina F foi demonstrada em ensaios *in vitro* com cinco linhagens de células cancerígenas humanas de hepatoma (HA 22 T), cérvix uterina (HeLa), nasofaringe (KB), cólon (Colo-205) e pulmão (Calu-1). A fisalina F também manifestou efeito antineoplásico *in vivo* contra células P 388 na leucemia linfocítica em camundongos (CHIANG *et al.*, 1992).

A fisalina B foi estudada por Chiang *et al.* (1992a) e Chiang *et al.* (1992b) e como resultado verificaram a atividade antitumoral deste componente. Em trabalho de Ribeiro *et al.* (2002) foi demonstrado efeito antineoplásico do extrato etanólico de *P. angulata*, mostrou uma significativa inibição de células de linfoma de camundongos e carcinoma de Erlich. A partir do extrato metanólico de *P. angulata*, foi evidenciada no trabalho de HSIEH *et al.* (2006) a atividade apoptótica e anti proliferativa de células de câncer de mama.

Para as fisalinas B, F e G foi apontada uma potente atividade de imunossupressão de macrófagos, além da inibição *in vitro* da atividade de esplenócitos e a rejeição ao transplante halogênico *in vivo* (SOARES *et al.*, 2003; SOARES *et al.*, 2006). Acerca das atividades antiinflamatórias e imunomoduladoras atribuídas aos componentes de *P. angulata*, Soares *et al.* (2003) demonstrou a ação das fisalinas B, F e G como potentes inibidores da produção de NO de 90-100% por macrófagos ativados por LPS e IFN- $\gamma$ .

Compostos fenólicos, como os polifenóis, flavonoides, esteroides e fisalinas possuem uma ação direta na capacidade antioxidante, citotóxica e antitumoral. Diversos estudos comprovam que os extratos derivados de plantas podem apresentar efeitos antitumorais em

modelos celulares, sendo os compostos fenólicos muitas vezes atribuídos a essas funções (CROZIER *et al.*, 2006; MIER-GIRALDO *et al.*, 2017).

Li & Fu (2004) afirmam que os compostos fenólicos representam substâncias promissoras para a terapia contra o câncer, por induzir morte celular e de células tumorais. Em estudos de Mier-Giraldo *et al.* (2017) foram avaliados os potenciais citotóxicos e imunomoduladores de extratos do fruto de *Physalis peruviana* em cultura de células de câncer cervical (HeLa) e células de fibroblastos (L929). Os resultados apontaram que pode haver relação entre o teor total de polifenóis com a atividade antioxidante e citotóxica, no entanto, irá depender do tipo de solvente utilizado para a obtenção dos extratos. Foram demonstrados potencial anti- cancerígeno e imunomodulador dos extratos, que indica potencial para o desenvolvimento e prospecção de novos produtos farmacêuticos.

Os flavonoides compõem o grupamento mais numeroso de moléculas dentro dos metabólitos fenólicos secundários, difundidos através do reino vegetal. Possuem em sua estrutura a presença de três anéis aromáticos. Esses compostos podem ser encontrados em diversas espécies vegetais e possuem a capacidade de atravessar a Barreira Hemato-Encefálica (BHE). Por esse motivo, despertaram a atenção da comunidade científica pela possibilidade de atuar como um agente antiglioma (CAROCHO & FERREIRA, 2013; ANSARI *et al.*, 2009; FORMICA & REGELSON, 1996; FARIA *et al.*, 2012).

A rutina é um flavonoide que pertence à sub-classe dos flavonóis, e possui importantes propriedades farmacológicas. É um composto abundante nas espécies de feijão brasileiro *Dimorphandra mollis* Benth, conhecido popularmente como faveiro. Possui atividades antiproliferativas, pró-apoptóticas e morfogênicas nas células de glioblastoma humano (GL-15) (FRANCHIMAND *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2011).

Em trabalho recente do nosso grupo de pesquisa, Bispo da Silva *et al.* (2020), investigaram as propriedades antitumorais dos flavonóis rutina e quercetina em monocultura de células C6 de glioblastoma e em co-cultura de C6. Foi observado que ambos os flavonoides induziram a inibição da proliferação de células tumorais e diminuição da migração celular. Foi demonstrado também que a rutina induziu a diferenciação em cultura celular de glioblastoma e capacidade inibitória do crescimento celular. Sugeriu-se que, a partir desses resultados, a rutina pode ser um possível candidato para o tratamento de gliomas malignos.

A isorhamnetina é um flavonoide presente em diversas plantas, frutas e vegetais. Possui um amplo espectro de efeitos farmacológicos, como atividades anti-inflamatórias, antioxidante, capacidade citoprotetora, efeitos cardiovasculares, antiproliferativos e antitumoral (DOU *et al.*,

2014; KUTI, 2004; YANG *et al.*, 2013; SAUD *et al.*, 2013; DING *et al.*, 2012; TENG *et al.*, 2006).

A atividade antitumoral exercida pela isorhamnetina foi demonstrada em diversos estudos com diferentes células tumorais, como em células de câncer cervical humano (WEI *et al.*, 2018), câncer de pulmão (RUAN *et al.*, 2015), câncer de cólon (ANTUNES-RICARDO *et al.*, 2014), câncer de mama (HU *et al.*, 2019), câncer de pâncreas (WANG *et al.*, 2018) entre outros cânceres.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar os efeitos do extrato etanólico do caule de *Physalis angulata* em cultura de células de linhagem C6 murina.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Verificar os efeitos citotóxicos do EEPA nas células de glioblastoma multiforme de rato (C6)

Comparar os efeitos do EEPA no metabolismo mitocondrial nas células de glioblastoma multiforme de rato (C6).

Investigar o efeito do EEPA na migração e progressão nas células de glioblastoma multiforme de rato (C6).

Avaliar e quantificar a expressão da proteína EGFR na cultura de células de glioblastoma multiforme de rato (C6) moduladas com o EEPA.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular (LabNq), localizado no Instituto de Ciências da Saúde (ICS) da Universidade Federal da Bahia (UFBA) e Laboratório de Bioquímica e Imunologia Veterinária (LBIV) da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB).

### **4.1 EXTRATO ETANÓLICO DE *PHYSALIS ANGULATA***

O espécime da *Physalis angulata* foi obtido do campo experimental da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, na cidade de Cruz das Almas - BA, Brasil.

Após a coleta da planta, todo o procedimento foi realizado por Freitas (2019). O material foi higienizado e colocado em estufa de circulação de ar para realizar a secagem. Posteriormente, os caules foram triturados em moinho de facas para obter 500g de matéria seca triturada. Em seguida, foi feita a extração dos metabólitos secundários através da maceração exaustiva em etanol P.A, sendo realizadas coletas a cada 72 horas do solvente, que foi filtrado e substituído, e esse procedimento foi repetido 3 vezes. O conteúdo obtido nas extrações passou por destilação do solvente em evaporador rotatório, sob pressão reduzida a uma temperatura média de 50° C. Para que houvesse evaporação total do etanol, o extrato obtido foi colocado em capela de exaustão e pesado diariamente até não mais apresentar variação na massa.

### **4.2 ANÁLISE QUÍMICA DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE *PHYSALIS ANGULATA***

O extrato etanólico bruto de *P. angulata* foi analisado quimicamente por Freitas (2019) e obtido através de espectrometria de massas acoplada a espectrometria de massas (EM-EM). Foi identificada a presença de compostos em duas faixas estruturais, que foram comparadas com dados da literatura, possibilitando caracterizar estruturalmente estes compostos. Foram identificados compostos da classe das physalinas (A, B e E) bem como compostos da classe dos flavonoides glicosilados (rutina e isorhamnetina) (Anexo 1).

### **4.3 Modelos de estudo**

### **4.3.1 Cultura de células C6 de glioblastoma**

As culturas de células confluentes, cultivadas em placas de 100mm foram descoladas utilizando-se solução de tripsina 0,05% e EDTA 0,02% diluídos em PBS, e replaqueadas em placas de poliestireno de 4cm de diâmetro de 24 ou 96 poços (TPP) a uma densidade de  $2 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> em meio Dulbecco modificado (DMEM, Cultilab) suplementado com 10% de SFB, 0,011g/L de ácido pirúvico, 2nM de L-glutamina, 100UI/mL de penicilina G e 7mM de glicose, incubadas a 37° C em atmosfera úmida controlada contendo 5% de CO<sup>2</sup>.

Passadas 24 horas após o plaqueamento das células, estas foram tratadas com o EEPA nas concentrações 0,5µg/mL, 1µg/mL e 2,5 µg/mL e mantidas por um período de 24 horas.

## **4.4 ENSAIOS**

### **4.4.1 Citotoxicidade avaliada por MTT**

O teste de citotoxicidade por brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) em cristais de formazan, analisa a viabilidade celular por meio da função do metabolismo mitocondrial. Para isso, as células após modulação de 24 h, foram lançadas em placas de cultivo de 96 poços, adicionados 100 µL de solução de MTT (Sigma, M2128) em cada poço, a uma concentração final de 1mg/mL e incubadas em estufa com atmosfera umidificada com 5% de CO<sup>2</sup> a 37°C durante 2h.

Após a incubação, 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 protegidas da luz. Posteriormente, as placas foram submetidas à leitura em espectrofotômetro a 540 nm para quantificação da absorbância de radiação.

### **4.4.2 Dosagem de Óxido Nítrico (NO)**

Para a dosagem do óxido nítrico, foi utilizada a reação colorimétrica de Griess, que consiste na mensuração de nitrito (NO<sub>2</sub>), um metabólito resultante da oxidação do NO, encontrado nos sobrenadantes da cultura previamente coletados.

Após o período de modulação de 24 horas, o meio de cultura foi recolhido e distribuído, em triplicata, em placa de 96 poços. Foram adicionados 50µL de solução de Griess (1% de sulfanilamida e 0,1% de naftil-etilenodiamina (NEED) em 2,5% de ácido fosfórico) em todos os poços. Nesta reação, o nitrito reage com a sulfanilamida em meio ácido. O composto diazo

formado, reage com o cloridrato de N-(1-naftil)etilenodiamina, gerando um produto de coloração rósea. Após acrescentados os reagentes, será realizada a medição da absorbância a 540 nm em leitor de placas.

#### **4.4.3 Coloração Rosenfeld**

Após o período de tratamento de 24 horas, as células foram lavadas três vezes com PBS, fixadas e permeabilizadas com metanol a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos. As células fixadas foram coradas segundo o protocolo estabelecido por Rosenfeld (1947). O reagente foi adicionado às placas contendo as células previamente tratadas em volume suficiente para cobrir completamente o tapete celular. Decorridos 3 minutos, foram adicionadas 20 gotas de água destilada à solução corante, deixando agir por 20 minutos em temperatura ambiente. As placas foram então lavadas em água corrente e secas ao ar livre. Após secar em temperatura ambiente, as células foram examinadas no Microscópio Invertido Eclipse TS100 (Nikon Instruments Inc., Americas) em objetiva de 20x e fotografadas com Câmera Leica (DFC7000 T com o software Leica Application Suite).

#### **4.4.4 Ensaio de migração das células C6 moduladas com EEPA**

Para avaliação do potencial do EEPA em inibir a migração das células de C6, foi realizado um ensaio em monocamada celular. As células tumorais foram plaqueadas em placas de 24 poços (TPP) a uma concentração de 30 mil células/poço. Após a formação da monocamada celular confluyente, foi promovida uma lesão uniforme com o auxílio de uma ponteira de 200 $\mu\text{l}$  no tapete celular. Em seguida, foi realizada uma lavagem das células com PBS estéril para retirada das células desprendidas durante a lesão. Em seguida, as placas foram moduladas nas concentrações de 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$  e 2,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  em meio de cultura DMEM sem SFB e o controle foi com DMSO 0,1%.

Após 0, 24 e 48 horas, as células foram observadas em microscópio de contraste de fase (Nikon TS-100) e em seguida, fotografado por câmera digital (Nikon E-4300). A migração celular foi avaliada por software ImageJ (NIH, Bethesda, MD) a partir da distância entre as margens celulares.

#### 4.4.5 Análise imunocitoquímica da expressão da proteína EGFR

Após a exposição ao EEPA nas concentrações 0,5 µg/mL, 1 µg/mL e 2,5 µg/mL durante 24 horas, o meio de cultura foi desprezado e os poços com tapete celular foram lavados por três vezes com PBS em pH 7,4. As células foram então fixadas e permeabilizadas com metanol durante dez minutos a -20°C. O excesso de metanol foi desprezado e as placas ficaram abertas até a completa evaporação do metanol.

A seguir, as células foram reidratadas com PBS e permeabilizadas com Triton X-100 a 0,2% e bloqueadas com SFB a 10% por 1 hora, e incubadas com o anticorpo primário IgG anti-EGFR produzido em coelhos (1:500 Santa Cruz) durante 3 horas em câmara úmida.

Decorrido o tempo de incubação dos anticorpos primários, as células foram lavadas três vezes com PBS e incubadas com o anticorpo secundário anti IgG de coelhos na proporção de (1:500) por 1 hora à temperatura ambiente.

Após o tempo de incubação, os núcleos celulares foram corados com o agente intercalante de DNA fluorescente 4',6-diamidino-2-phenilindol diidrocloreto (DAPI, Molecular Probes, Eugene, OR) (5µg/mL) durante 5 min à temperatura ambiente. As células foram então lavadas com PBS e fotografadas por microscopia de fluorescência Olympus BX-2; Olympus, Melville, New York, USA.

#### 4.4.6 Western Blotting

A expressão de EGFR foi avaliada pela técnica de *Western Blotting*. A quantidade da proteína de interesse foi previamente dosada pelo método de Lowry seguindo as recomendações do fabricante (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA).

Para a realização da eletroforese, foi utilizado 15µg de proteína de cada amostras que foram preparadas em tampão de Laemmli (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) e desnaturadas a 100°C durante 5 minutos. A corrida foi realizada em cuba de eletroforese contendo gel de migração (H<sub>2</sub>O destilada, Tris-HCl 1,5 M (pH 8,9), SDS 10%, Bis-acrilamida, PSA (100mg/mL) e TEMED) e de empilhamento (H<sub>2</sub>O destilada, Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8), SDS 10%, Bis-acrilamida, PSA (100mg/mL) e TEMED). O aparelho de eletroforese foi configurado a 180 V durante 45 minutos para que ocorresse a corrida das proteínas no gel.

Após a corrida, o gel foi transferido para uma membrana de PVDF (fluoreto de polivinilideno; Immobilon-P, Millipore) previamente permeabilizada em metanol durante 15 segundos, H<sub>2</sub>O por 2 minutos e tampão de transferência 1x (Tris-glicina (10x), metanol e H<sub>2</sub>O

destilada) por 5 minutos. A transferência para a membrana de PVDF ocorreu em 100 V durante 1 hora.

Posteriormente, as membranas foram bloqueadas durante 1 hora em temperatura ambiente, sob agitação orbital, em solução a 5% de leite em pó desnatado com PBS-T 1%. Após o bloqueio, as membranas foram lavadas com PBS-T a 1%, e posteriormente, incubadas com os anticorpos primários IgG anti-EGFR produzido em coelhos, na diluição de 1:500 a 4° C overnight.

Decorrida a incubação, as membranas passaram por incubação com o anticorpo secundário durante 1 hora, conjugados com peroxidase (HRP) (1: 5000 em TBS-T, Bio-Rad). A visualização das bandas imunorreativas foi realizada através de scanner LAS 500 por exposição de quimioluminescência utilizando o kit de substrato Imuno-Start HRP (Bio-Rad).

A quantificação das bandas foi obtida por densitometria e analisados através do software ImageJ 1.33u (Wayne Rasband, Institutos Nacionais de Saúde, EUA), e gerados os gráficos da área no programa GraphPad Prism 8.10 (California, EUA).

#### **4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

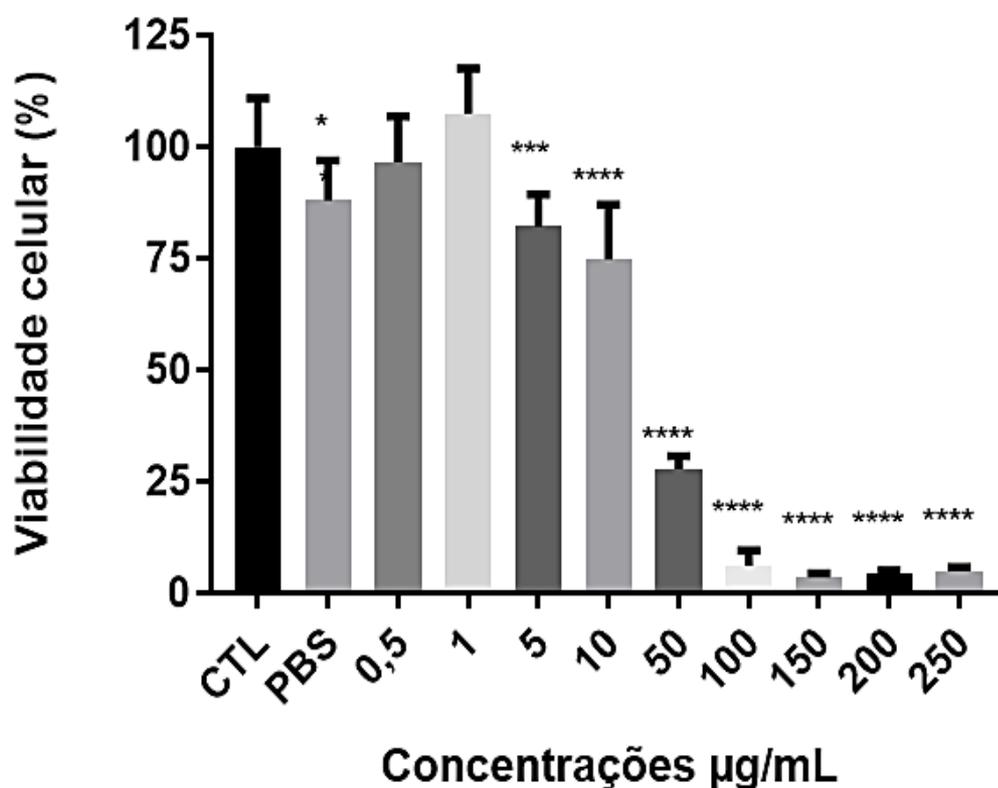
Os resultados foram analisados pelo programa estatístico GraphPadPrism 8.10 (California, EUA) e os dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão médio dos parâmetros avaliados. A normalidade dos dados foi avaliada através do teste de Shapiro-Wilk.

Para avaliar a diferença estatística dos dados paramétricos foi realizado o teste One Way ANOVA. Para dados não paramétricos foi realizado teste de Kruskal-Wallis. Os pós testes utilizados foram o Dunn's e Tukey. Os valores de  $P < 0,05$  foram considerados com significância estatística.

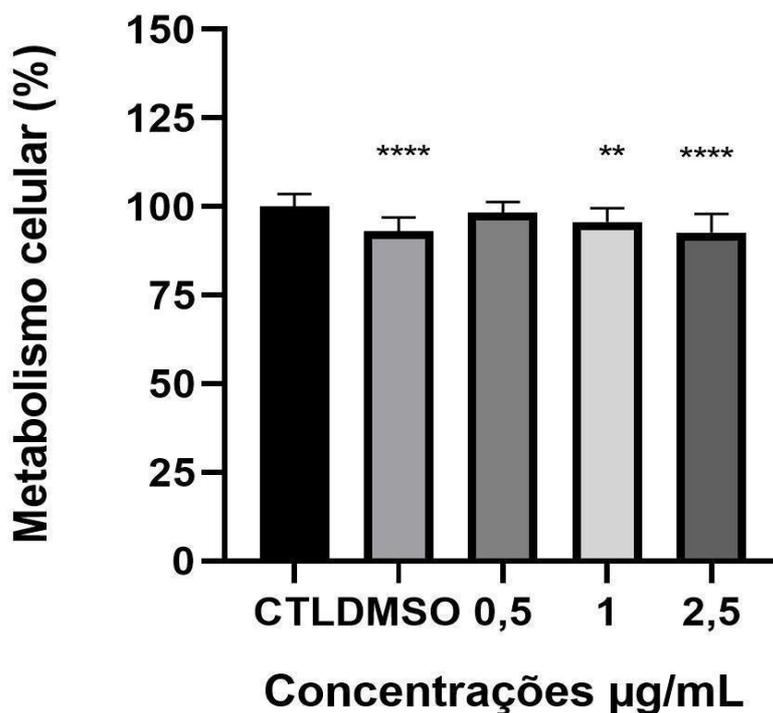
## 5 RESULTADOS

### 5.1 EFEITO DO EEPA SOBRE O METABOLISMO CELULAR

O ensaio de MTT demonstrou que o tratamento por 24h com EEPA nas concentrações 0,5  $\mu\text{g/mL}$  a 1  $\mu\text{g/mL}$  não apresentou citotoxicidade para as células C6 (Figura 6). No entanto, o metabolismo mitocondrial foi reduzido nas concentrações de 5  $\mu\text{g/mL}$  a 250  $\mu\text{g/mL}$  quando comparado com o controle. Diante disso, para os demais ensaios de proteção, adotou-se as concentrações de 0,5  $\mu\text{g/mL}$ , 1  $\mu\text{g/mL}$  e 2,5  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 7).



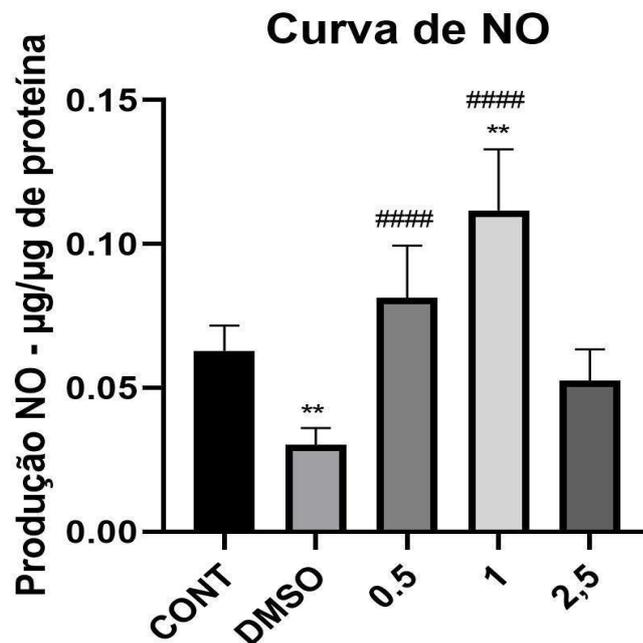
**Figura 6.** Análise do efeito do EEPA no metabolismo de células C6 verificadas através do teste de MTT. A significância estatística foi obtida utilizando o teste One way ANOVA seguido do pós-teste Dunn's, com (\*) representando a diferença estatística entre o grupo controle e os demais grupos tratamento, com valor de  $p < 0,05$ , (\*\*\*)  $p < 0,001$  e (\*\*\*\*)  $p < 0,0001$ .



**Figura 7.** Análise do efeito do EEPA no metabolismo de células C6 verificadas através do teste de MTT nas concentrações determinadas. A significância estatística foi obtida utilizando o teste One way ANOVA para dados paramétricos, seguido do pós-teste Dunn's, com (\*) representando a diferença estatística entre o grupo controle e os demais grupos tratamento, com valor de \*  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,001$  e (\*\*\*\*)  $p < 0,0001$ .

## 5.2 MENSURAÇÃO DO NO

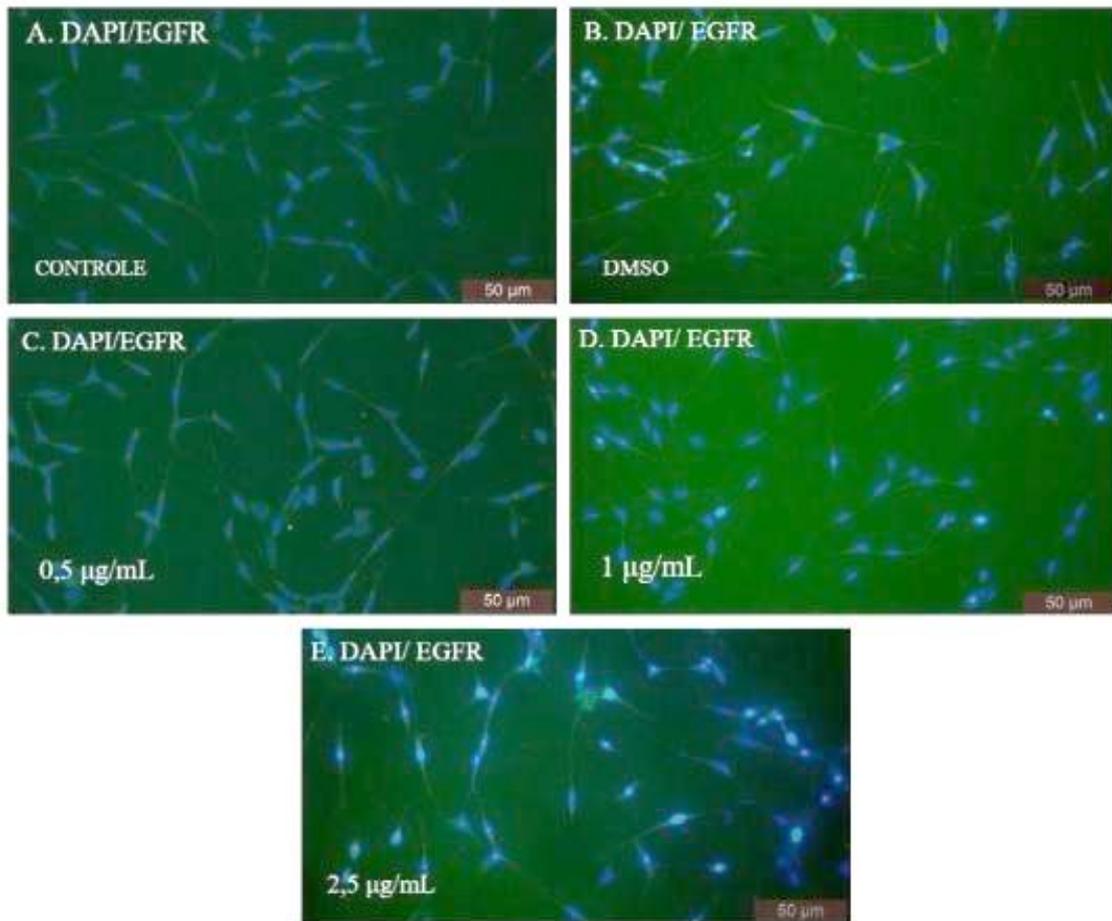
A produção de óxido nítrico foi determinada através do nível de nitrito no meio das culturas nas diferentes condições. Foi observado que na concentração 1 µg/mL houve um aumento representativo da presença de nitrito em relação ao grupo controle. Na concentração 0,5 µg/mL observa-se um discreto aumento quando se comparado ao controle. No entanto, na concentração 2,5 µg/mL o valor do nível de nitrito é próximo ao dos grupos controle. Também se observou uma diminuição considerável no nível de nitrito no controle por DMSO (Figura 8).



**Figura 8.** Dosagem de nitrito em culturas de células C6 em culturas controle e DMSO, e as tratadas com EEPA nas concentrações de 0,5µg/mL, 1µg/mL e 2,5µg/mL por 24h. Os dados são apresentados em média  $\pm$  DP. A significância estatística foi obtida utilizando o teste One way ANOVA para dados paramétricos e Kruskal Wallis para dados não paramétricos, seguido do pós-teste Dunn's. Com (\*) representando a diferença estatística entre o grupo controle e os demais grupos tratamento, com valor de \*  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,001$ , e (#) representando a diferença estatística entre o grupo DMSO e os demais tratamentos.

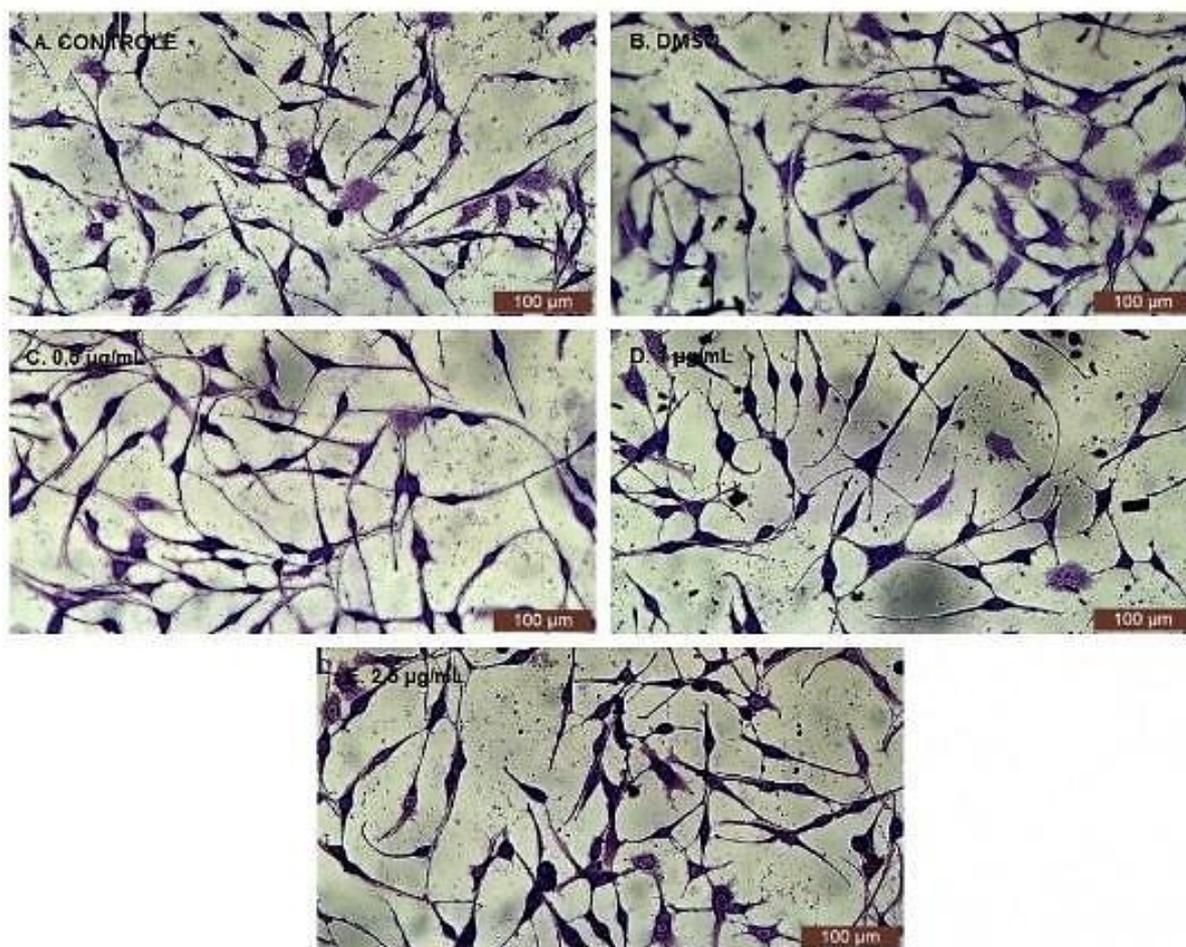
### 5.3 ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E DE EXPRESSÃO DE EGFR

Para verificar o efeito do EEPA sobre a morfologia em cultura de células C6 de glioblastoma, realizou-se a marcação imunocitoquímica para EGFR e a coloração por método Rosenfeld. Observou-se na marcação imunocitoquímica que nas culturas tratadas com o EEPA no período de 24 h, ocorreu uma menor expressão do receptor EGFR nas células C6 nas concentrações 1 µg/mL e 2,5 µg/mL (Figura 9).



**Figura 9.** Análise da morfologia de C6 por método imunocitoquímico. Cultura de células C6 tratadas com EEPA (0,5 µg/mL, 1 µg/mL e 2,5 µg/mL) num período de 24 horas. Marcação imunocitoquímica para EGFR (em verde) e DAPI (em azul). A - Condição controle (DMEM); B - Controle com DMSO 0,1 µg/mL; C - Tratamento com 0,5 µg/mL de EEPA; D - Tratamento com 1 µg/mL de EEPA; E - Tratamento com 2,5 µg/mL de EEPA.

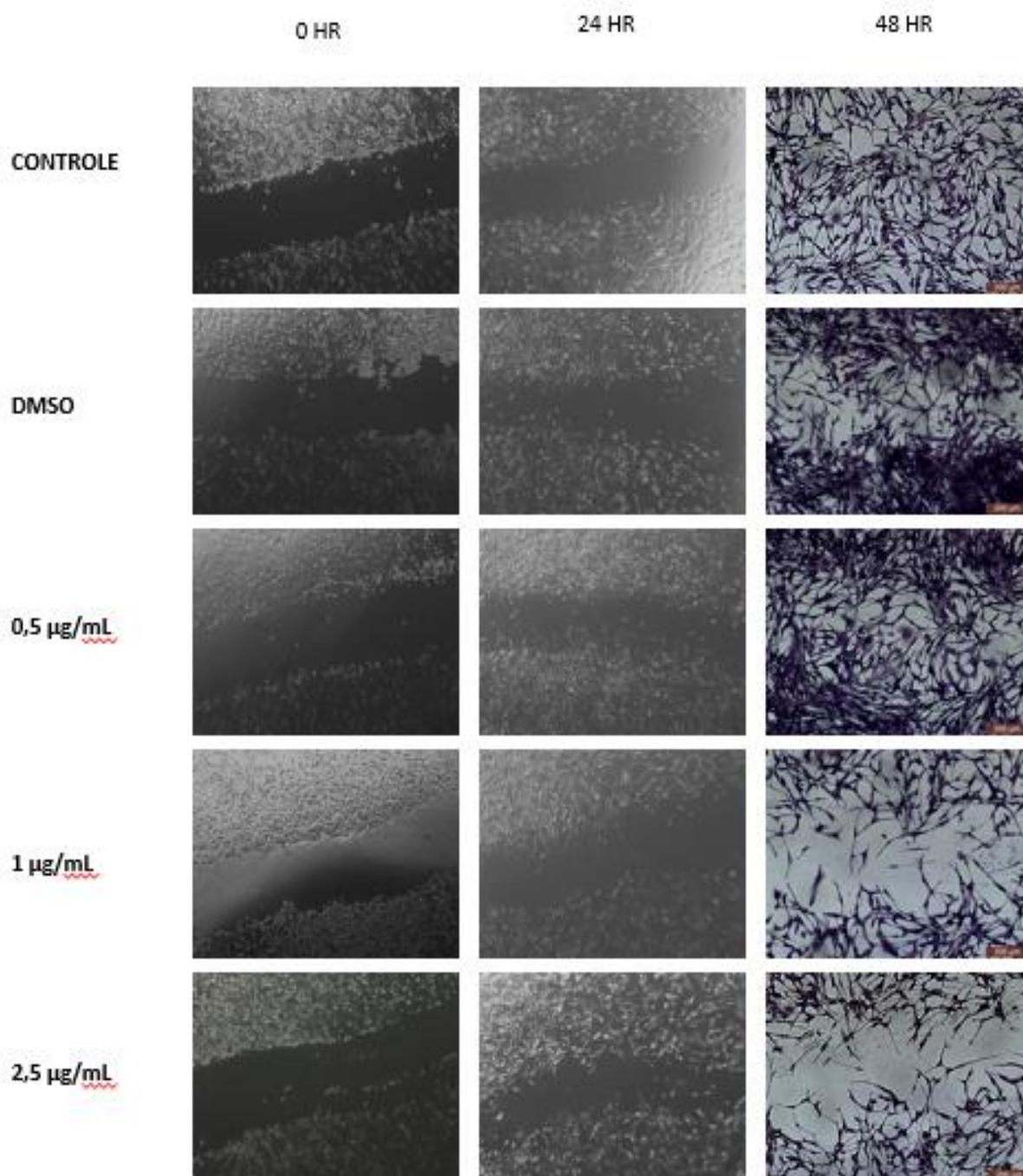
Já na coloração por Rosenfeld, o controle por DMSO possui menos células que se comparado ao controle. Na concentração 1 µg/mL as células apresentaram corpo celular maior se comparado às outras concentrações. Já na concentração 2,5 µg/mL quando comparado ao controle, as células apresentaram corpo celular menor e mais alongado. Nas concentrações 1 µg/mL e 2,5 µg/mL, observa-se menos células e presença de prolongamentos menores e mais finos (Figura 10).



**Figura 10.** Análise da morfologia de C6 por método Rosenfeld. Culturas de células C6 tratadas com EEPA (0,5 µg/mL, 1 µg/mL e 2,5 µg/mL) num período de 24 horas. Coloração Rosenfeld. A - Condição controle (DMEM); B - Controle com DMSO 0,1 µg/mL; C - Tratamento com 0,5 µg/mL de EEPA; D - Tratamento com 1 µg/mL de EEPA; E - Tratamento com 2,5 µg/mL de EEPA.

#### 5.4 EFEITOS MIGRATÓRIOS DAS CÉLULAS C6

Nas diversas concentrações, a partir de 24 h do início do experimento é possível visualizar a migração das células C6 para a zona de lesão da monocamada. Nos grupos controle, DMSO e 0,5 µg/mL houve o fechamento completo ao final do tempo de 48 horas. Nos grupos das concentrações 1 µg/mL e 2,5 µg/mL a migração das células para o centro da lesão ao final do tempo de 48 horas foi menor se comparada aos grupos controle e DMSO, não fechando a área de lesão ao final das 48 horas (Figura 11).



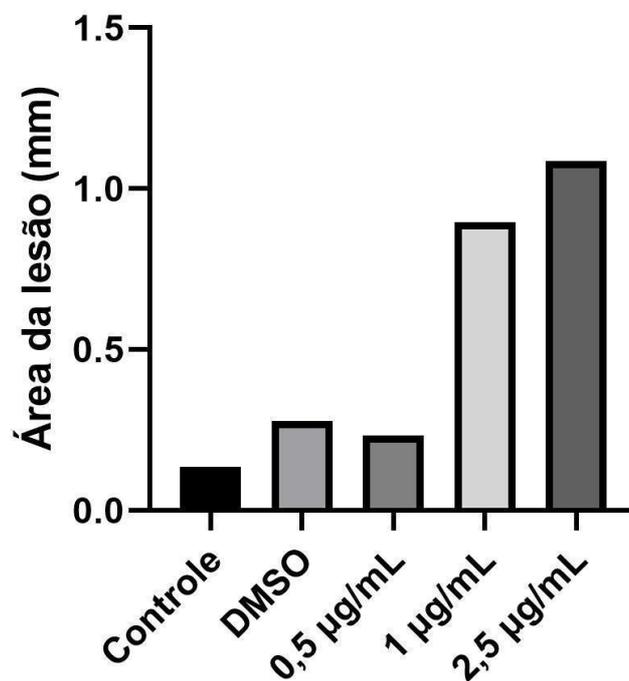
**Figura 11.** Efeito dos controles (DMEM e DMSO) na cultura de células C6 sobre a migração celular, avaliados após 0, 24 e 48 horas de experimento. Efeito das concentrações 0,5 µg/mL, 1 µg/mL e 2,5 µg/mL na cultura de células C6 sobre a migração celular, avaliados após 0, 24 e 48 horas de experimento. Culturas com 48 horas de migração celular foram coradas pelo corante de Rosenfeld

A quantificação da migração celular pode ser realizada utilizando a distância média da largura da ranhura entre as suas extremidades. Para isso, foi utilizado o software ImageJ (NIH, Bethesda, MD) medindo manualmente as imagens captadas no período de 48 horas após o

tratamento com as concentrações determinadas e corado por método Rosenfeld. A área da lesão foi determinada no comprimento de milímetros (mm).

Como resultados da quantificação da área livre da lesão nos diferentes grupos avaliados (Figura 12), tivemos no grupo controle, a média de 0.135 mm; no grupo DMSO a média foi de 0.277 mm. Já na concentração 0,5  $\mu\text{g/mL}$  a média foi de 0.232 mm; Na concentração 1  $\mu\text{g/mL}$  a média foi de 0.895 mm; e na concentração 2,5  $\mu\text{g/mL}$  a média de 1.087 mm.

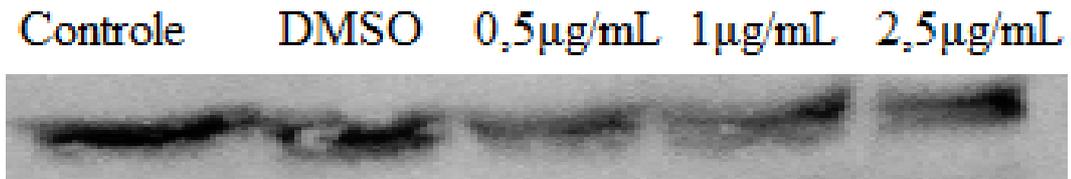
### Comprimento da área de lesão



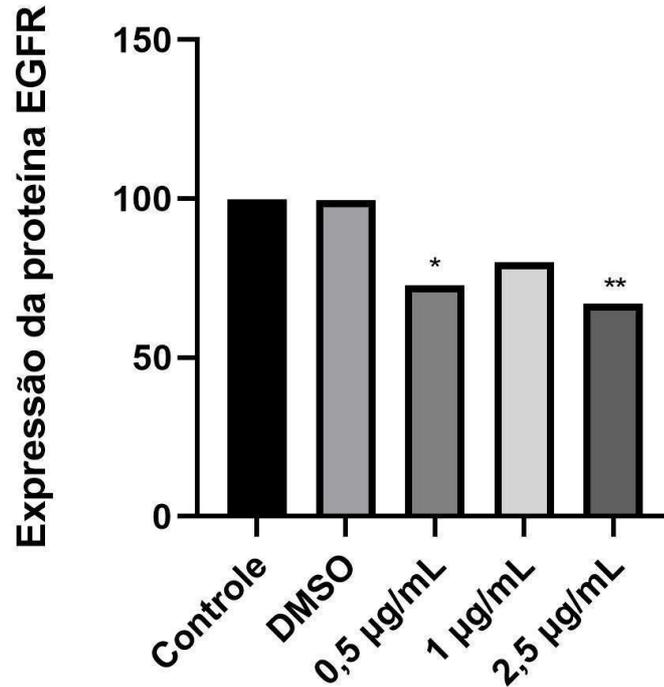
**Figura 12** Representação gráfica da área de lesão em mm referente ao comprimento entre as bordas do tapete celular de C6. A área foi medida manualmente no software ImageJ.

### 5.5 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA EGFR POR WESTERN BLOTTING

Foi demonstrado no imunoblotting a expressão da proteína EGFR em todas as concentrações (Figura 13). Grupos controle e DMSO apresentaram alta expressão da proteína EGFR. No entanto, nas concentrações 0,5  $\mu\text{g/mL}$ , 1  $\mu\text{g/mL}$  e 2,5  $\mu\text{g/mL}$  houve uma redução da expressão da proteína se comparado ao controle. A análise dos dados foi realizada por densitometria das bandas do Western blotting, através do software ImageJ e plotadas em um gráfico para quantificação (Figura 14).



**Figura 13.** Expressão de EGFR por western blotting. Bandas imunorreativas ao EGFR em grupo controle, DMSO e concentrações 0,5 µg/mL, 1 µg/mL e 2,5 µg/mL.



**Figura 14.** Gráfico da expressão da proteína EGFR nas concentrações controle, DMSO, 0,5 µg/mL, 1 µg/mL e 2,5 µg/mL. Para avaliar a normalidade, foi utilizado o teste Shapiro-Wilk. A significância estatística foi obtida utilizando o teste One way ANOVA para dados paramétricos e Kruskal Wallis para dados não paramétricos, seguido do pós-teste Dunn's. Com (\*) representando a diferença estatística entre os grupos controle e os demais grupos tratamento, com valor de \*  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,001$ .

## 6 DISCUSSÃO

Os produtos naturais são uma fonte ilimitada para a descoberta de drogas antitumorais. As plantas têm sido a mais abundante fonte na obtenção de drogas que tratam diversas formas de câncer. A prospecção de compostos isolados de plantas, como os metabólitos secundários, servem para desenvolver estratégias no desenvolvimento de novos agentes com potencial terapêutico (CRAGG & NEWMAN, 2005; GROSSO *et al.*, 2013; PAN *et al.* 2010).

Os extratos de *Physalis angulata* tem sido objeto de estudos biológicos que o apontam como detentor de funções antitumorais, antimicrobianas, antiinflamatórias, imunomoduladores, tripanossomicida, anti-hepatoma, antinociceptivo, dentre outras funções (TOMASSINI *et al.*, 2000; CHOI & HWANG, 2003; WU *et al.*, 2004).

A consequência de um amplo espectro de atividades atribuída às espécies do gênero *Physalis* é sem dúvida atrelada a diversidade estrutural e funcionalização apresentada pelos vitaesteróides, que são lactonas esteroidais do grupo de metabólitos secundários que demonstram grande potencial para utilização na medicina a partir dos seus diversos efeitos no organismo (RÜNGELER *et al.*, 1999; CÁRDENAS *et al.*, 1994).

O presente estudo investigou os possíveis efeitos do uso do extrato etanólico extraído de caule de *Physalis angulata* proveniente das fazendas experimentais da UFRB em células C6 de glioblastoma murino. Este extrato foi analisado quimicamente em estudos anteriores do grupo (FREITAS, 2019), onde foi identificada a presença dos flavonoides rutina e isorhamnetina, e três tipos de fisalinas (A, B e E).

No ensaio de MTT, onde é avaliada a capacidade das desidrogenases mitocondriais de células vivas converterem o substrato em formazan, as enzimas permanecem ativas somente em células vivas viáveis, portanto, a intensidade da cor violeta é proporcional ao número de células vivas. Os resultados obtidos revelaram que o EEPA na concentração de 0,5 µg/mL apresentou viabilidade celular igual ao do grupo controle. Já nas concentrações 1 µg/mL e 2,5 µg/mL houve uma leve redução da viabilidade, de 5% na concentração 1 µg/mL, e 8% na concentração 2,5 µg/mL. A redução da viabilidade celular a partir do metabolismo mitocondrial pode ser atribuída a atividade citotóxica promovida pelos compostos presentes no extrato.

Estudos feitos por Magalhães (2006) demonstraram a atividade antiproliferativa para extratos e frações de *Physalis angulata* em cânceres como da CEM (leucemia – humana), HL-60 (leucemia – humana), HCT-8 (côlon – humana), MCF-7 (mama – humano), B-16 (melanoma murino), PC-3 (próstata), MDA-MB-231 e MDA-MB-435 (mama) e K-562 (eritroleucemia). O extrato etanólico da *P. angulata* apresentou uma concentração inibitória

média < 8,0 µg/mL em todas as linhagens celulares, o que determinou um elevado potencial citotóxico.

Estudos feitos por Chiang *et al.* (1992a, 1992b), mostraram que o extrato etanólico de *P. angulata* possui atividade citotóxica em várias linhagens leucêmicas, como a HL-60, nas células HeLa (útero) e Calu (pulmão). Wu *et al.* (2004), demonstraram que o extrato etanólico de *P. angulata* foi capaz de inibir o crescimento de linhagens de células tumorais de fígado humano, para Hep G2 e PLC/PRF/5.

O óxido nítrico possui envolvimento em diversas reações orgânicas, e pode ser tanto benéfico quanto tóxico, a depender da sua concentração. O NO é o mais importante mediador citotóxico de células imunes no organismo. É um radical livre que pode ter função tanto oxidante quanto redutora. Apesar do potencial citotóxico, que vem a prejudicar as células sanguíneas, o NO também assume papel de mensageiro químico, ativando ou inibindo moléculas do sistema imunológico. Esse potencial citotóxico do NO é oportuno durante respostas imunológicas onde provoca danos oxidativos letais em células-alvo, podendo estas serem células tumorais e bactérias. O aumento nos níveis de NO pode ser importante na defesa contra invasores celulares, tumores celulares e lesões vasculares (SNYDER & BREDT, 1992; BARRETO & CORREIA, 2005; CERQUEIRA & YOSHIDA, 2002; KUO & SHROEDER, 1995; GABOURY *et al.*, 1993; PAYNE & KUBES, 1993; YAN *et al.*, 1996).

No presente estudo foi possível observar que o tratamento com o EEPA induziu um aumento na produção de NO nas concentrações 0,5 µg/mL e 1 µg/mL, sendo o aumento em 1 µg/mL mais representativo, enquanto que na concentração 2,5 µg/mL ocorreu uma diminuição na produção do NO quando se comparado ao controle. Nas concentrações 0,5 µg/mL e 1 µg/mL onde houve um aumento da produção do NO, pode ser explicada a partir do aumento da produção de óxido nítrico sintetase (iNOS) quando há a polarização do perfil de resposta Th1 nos glioblastomas, estes sendo responsáveis por alterações imunológicas que favorecem a eliminação de células tumorais. Nakamura & Lipton (2009) afirmam que níveis elevados de NO podem afetar a permeabilidade celular, resultando em déficit nas trocas iônicas, liberação de enzimas hidrolíticas lisossomais e posteriormente resultando em morte celular.

Xue *et al.* (2016) mostrou um aumento na expressão de iNOS após estímulo com LPS/IFN $\gamma$  em cultura de células de glioblastoma/microglia humanas estimuladas com ácido clorogênico. A redução do óxido nítrico na concentração 2,5 µg/mL corrobora com estudos como o de Soares *et al.* (2003) que mostraram os efeitos de fisalinas (B, F e G) isoladas do extrato etanólico de *P. angulata* agiam reduzindo a produção de NO em cultura de macrófagos

ativados com LPS e interferon- $\gamma$ . Já no estudo feito por Bellintani *et al.* (2002) foi verificada a ação das fisalinas B, F e G na inibição do NO e citocinas pró inflamatórias, bem como reversão do choque endotóxico. Soliman & Mazzio (1998) afirmam que, compostos polifenólicos como a rutina, possuem a capacidade de induzir a produção do NO. Rosa (2019) mostrou que a suplementação de rutina na dieta de jundiás afetou os níveis de óxido nítrico, reduzindo-os, bem como aumentou a atividade da superóxido dismutase.

A linhagem C6 é constituída de tipos celulares morfológicamente distintos, tais como células poligonais e células finas e alongadas (ARMELIN *et al.*, 1982). Na análise morfológica por método de Rosenfeld, são observadas alterações nas células nas diferentes concentrações. Pode-se observar que no DMSO possui menos células que se comparado ao controle. Na primeira concentração testada, a 0,5  $\mu\text{g/mL}$ , não foi observada alteração morfológica das células em relação ao controle.

Na concentração 1  $\mu\text{g/mL}$  as células apresentaram corpo celular maior se comparado às outras concentrações, o que sugere que as células estão respondendo a modulação pelo extrato. Quando observamos a curva da produção de NO, a concentração 1  $\mu\text{g/mL}$  apresentou um aumento considerável em comparação ao grupo controle. Já quando analisamos a atividade metabólica celular avaliada pelo método do MTT, a concentração 1  $\mu\text{g/mL}$  apresentou uma leve redução do metabolismo celular quando comparada ao grupo controle. O aumento na produção do NO na concentração 1  $\mu\text{g/mL}$  pode indicar que nesta concentração o NO está elevado em relação às outras concentrações na intenção de debelar as células tumorais a fim de induzirem a morte celular tumoral.

Já na concentração 2,5  $\mu\text{g/mL}$  quando comparado ao controle, a morfologia das células apresentaram corpo celular menor e mais alongado. A retração do corpo celular e a emissão de finos prolongamentos sugere que a célula está em remissão ou em processo de morte celular. Essa premissa pode ser reforçada ao analisar a curva do NO, quando na concentração 2,5  $\mu\text{g/mL}$  houve uma queda considerável na produção de NO, que pode sugerir que houve uma diminuição na proliferação de células C6, que foi resultado da falta de células viáveis e, portanto, produzindo menos NO, bem como também migrando menos.

Reforçando essa possibilidade, quando analisados o gráfico do metabolismo celular por MTT, foi na concentração 2,5  $\mu\text{g/mL}$  que ocorreu a maior queda na atividade metabólica celular, quando comparada à concentração controle. Podemos sugerir que, na concentração 1  $\mu\text{g/mL}$  as células tumorais sofriam a ação dos compostos, no entanto, ainda haviam muitas células viáveis e liberando NO como forma de defesa aos componentes antitumorais e

citotóxicos da rutina e das fisalinas. No entanto, na concentração 2,5 µg/mL o metabolismo celular caiu consideravelmente, podendo indicar declínio nas atividades metabólicas celulares causadas por uma concentração efetivamente mais potente do extrato.

No entanto, tanto nas concentrações 1 µg/mL quanto na 2,5 µg/mL observou-se uma redução na quantidade total de células, além da presença de prolongamentos menores e mais finos. Ao comparar com os resultados dos testes de migração celular, são nestas mesmas concentrações que é observado um menor avanço das células C6 na lesão, quantificadas em comprimento (mm) e apresentadas na forma de gráfico de barras.

A migração celular é o processo em que células se movimentam de um local para o outro, e esse processo faz parte de etapas patológicas e fisiológicas do organismo, dentre as quais se destacam cânceres, inflamação e cicatrização de feridas (HULKOWER; HERBER, 2011). As metodologias para quantificar e examinar a migração celular são ferramentas úteis para triagem de drogas anticâncer. O ensaio de migração, também conhecido como “ensaio de ranhura” é um método simples e econômico para estudar a migração celular. Nesta técnica, é realizada uma lesão em uma monocamada celular confluyente, e a taxa de fechamento da fenda e a migração celular podem ser quantificadas a partir de fotografias feitas em diferentes períodos de tempo em microscópio adequado para tal procedimento. A migração celular é fundamental em muitos processos biológicos, como reparo e regeneração tecidual (CONDEELIS *et al.*, 2005; LIANG *et al.*, 2007).

No ensaio de migração celular, as concentrações 1 µg/mL e 2,5 µg/mL demonstraram uma redução da invasão celular na lesão induzida no tapete celular, o que pode reforçar que o composto possui atividade antitumoral. É importante ressaltar que a ocupação das áreas livres da lesão não somente são ocasionadas pela migração celular, são também pela proliferação das linhagens que conforme se dividem, vão ocupando os espaços vazios disponíveis (MENEZES, 2011).

Hseu *et al.* (2011) demonstraram em seu trabalho o efeito antiproliferativo do extrato de *P. angulata* em células de carcinoma escamoso humano (HSC-3). Foi observado que em concentrações sub citotóxicas de extratos de *P. angulata* (5-15 µg/mL) houve uma inibição da migração e invasão das células HSC-3 altamente metastáticas, de uma forma dependente de dose e de tempo promovido pelo ensaio de reparo de cicatrização de feridas e ensaio transwell.

Wang *et al.* (2021) estudaram a potencial atividade anti cancerígena do physapubenolideo (PB), um composto extraído da *Physalis minima*, em células de melanoma. O estudo demonstrou a capacidade do PB de induzir apoptose celular, inibindo a proliferação

e migração das células de melanoma de forma concentrada e dependente de concentração, a partir do ensaio de migração “wound-healing assay”.

Bispo da Silva *et al.* (2019) investigaram em modelos *in vitro* e *in vivo* o potencial do flavonoide rutina e quercetina (aglicona da rutina), a partir de interações diretas e indiretas a modulação da resposta microglial e seu impacto na viabilidade celular do glioma, visto que as interações microglia-glioma favorecem o crescimento e invasão tumoral. Além dos mecanismos inflamatórios incluídos nas propriedades anti-glioma de ambos os flavonoides. Para este estudo, foi utilizada a concentração de 50  $\mu\text{M}$  tanto da rutina quanto da quercetina. Foi caracterizado o efeito direto de ambos os flavonoides na proliferação e migração das células de glioma C6.

No ensaio de migração realizado por Bispo da Silva *et al.* (2019), foi possível visualizar após as 24h do início do experimento as células C6 entrando na área da lesão e fechamento quase que completo da lesão após 48 horas. No entanto, quando as culturas foram tratadas com rutina ou quercetina, foi observada uma inibição da propriedade migratória das células C6 desde 24 horas após o início dos tratamentos.

Os resultados obtidos por Bispo da Silva *et al.* (2019) que indicam que a rutina e a quercetina inibem a migração das células de glioma, corroboram os estudos anteriores realizados por Santos *et al.* (2011) e Santos *et al.* (2015).

Diversos estudos já demonstraram que a interrelação entre microglia-glioblastoma desencadeia uma resposta imunológica regulamentar que é responsável pela agressão e invasão do glioblastoma. Bispo da Silva *et al.* (2017) caracterizou que a rutina na concentração de 50  $\mu\text{M}$  pode levar a indução da ativação e modulação do perfil inflamatório da microglia *in vitro*. Para investigar se o efeito do tratamento com rutina ou quercetina interferia na resposta microglial inflamatória, foram realizados ensaios de quimiotaxia em sistema transwell. Os resultados indicaram que a exposição das células de glioma C6 à rutina ou quercetina pode induzir, indiretamente, a secreção de fatores solúveis além da ativação e proliferação microglial.

Os compostos presentes na análise química do extrato etanólico bruto de *P. angulata*, diante dos estudos citados anteriormente, demonstram uma ação antitumoral potente, aliado a inibição da progressão e migração de células tumorais, aliado a capacidade modulatória da resposta inflamatória no microambiente tumoral. Podemos atribuir aos compostos presentes no EEPA a participação na inibição da migração celular de C6 relatada no presente estudo, podendo ser as responsáveis pelo menor deslocamento das células C6 em direção a lesão feita

mecanicamente no tapete celular cultivado, demonstrando seu potencial antitumoral e antimigratório já descrito na literatura.

O EGFR é uma glicoproteína transmembrana relacionado a proliferação e manutenção do crescimento celular. A superexpressão do EGFR na membrana de células tumorais levam ao aumento da atividade proliferativa e capacidade invasiva do tumor. O EGFR é expresso em altos níveis em diversos tipos de células tumorais, sendo encontrado em gliomas, mais especificamente em glioblastomas (LACOUTURE MELOSKY, 2007; YARDEN & SLIWKOWSKI, 2001).

A análise da expressão da proteína EGFR foi realizada a partir de métodos imunocitoquímicos e western blotting. As culturas tratadas com o EEPA no período de 24 horas, e analisadas por imunocitoquímica, apresentaram uma menor expressão do EGFR nas concentrações 1 µg/mL e 2,5 µg/mL, o que pode ser explicado pela possível redução tumoral causada pelo EEPA para com as células C6, alterando diretamente a quantidade expressa de EGFR tanto pela imunocitoquímica, quanto na vista pelo western blotting, onde os resultados corroboram na diminuição dose-dependente. Nas concentrações 0,5 µg/mL e 2,5 µg/mL houve uma redução considerável da expressão da proteína EGFR com significância estatística quando se comparado com o controle (100%). Essa redução pode ser consequência dos fatores antitumorais encontrados nos compostos presentes no EEPA.

Uma possível explicação para a redução da expressão do EGFR foi sugerida por Stockhausen *et al.* (2014) onde demonstraram que, ao inibir a sinalização do EGFR e EGFRvIII (variante 3 do EGFR), induziu a uma diferenciação celular, diminuição da capacidade tumorigênica *in vitro* e redução do potencial de células bCSC (células-tronco cancerígenas cerebrais). No entanto, numa superexpressão destes mesmos fatores, como relatada por Stockhausen *et al.* (2014), houve um favorecimento da proliferação das células tumorais.

No ensaio imunocitoquímico de Bispo da Silva *et al.* (2019) com alpha tubulina, uma proteína de citoesqueleto, foi demonstrada uma redução considerável na proporção de células C6 aderentes após o tratamento com os flavonoides, sendo a morfologia das células descritas como fenótipo bipolar mais fino em comparação com o controle.

Dessa forma, os resultados apontam o EEPA como um possível composto a ser utilizado no tratamento dos gliomas. A análise dos resultados de nossos experimentos indica que a atividade biológica do EEPA sobre as células C6 de glioblastoma depende do tempo de exposição e das concentrações adotadas. A concentração 1 µg/mL indicou ser a mais promissora para o objetivo ao qual este trabalho se propõe.

## 7 CONCLUSÃO GERAL

Este trabalho, de forma inédita, investigou os efeitos citotóxicos e antitumorais do uso do extrato etanólico do caule de *Physalis angulata* L. em células de linhagem tumoral de glioblastoma murino C6. Os resultados apresentados permitem concluir:

1- Os componentes presentes no extrato promoveram alterações morfológicas nas células C6;

2- O extrato e seus componentes induziram citotoxicidade do tipo dose dependente na linhagem de células C6;

3- O extrato induziu a redução na viabilidade celular e provocou morte celular de maneira dose dependente;

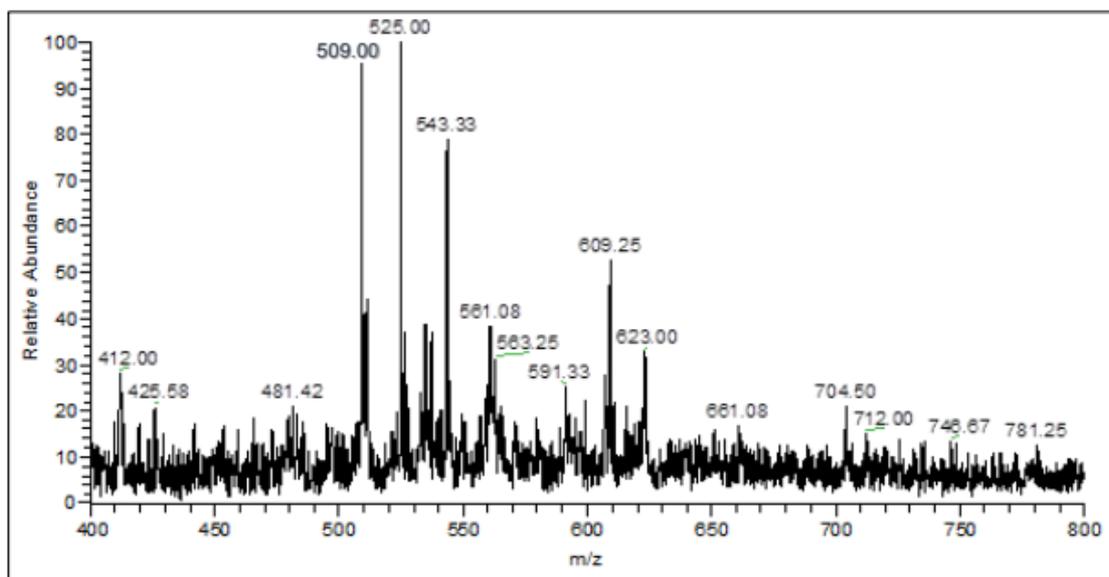
4- O extrato diminuiu a capacidade migratória das células C6 de forma dose dependente;

5- O extrato reduziu a expressão da proteína EGFR nas células C6.

Nossos resultados sugerem que o EEPA pode ser considerado candidato como adjuvante para o tratamento de glioblastomas. No entanto, estudos mais detalhados são necessários para compreender melhor o mecanismo de ação deste composto em tumores malignos.

## ANEXO

Espectro e íons totais do extrato etanólico bruto do caule de *Physalis angulata*



Fonte: FREITAS (2019)

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Cellular and Molecular Immunology**. 9 ed. Elsevier, 2019. 608 p.
- AGARWALA, S. S.; KIRKWOOD, J. M. Temozolomide, ael alkylating agent with activity in the central nervous system, improve the treatment of advanced metastatic melanoma. **Oncologist**, v. 5, n. 2, p. 144-151. 2001.
- AGRA, M. F. et al. Medicinal and poisonous diversity of the flora of "Cariri Paraibano", Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 383-395, 2007.
- ALMEIDA, E. R. **Plantas Medicinais Brasileiras: conhecimentos populares e científicos**. São Paulo: Hemus Editora. 1993. 341 p.
- ANJUM, K. et al. Current status and future therapeutic perspectives of glioblastoma multiforme (GBM) therapy: A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, n. 92, p. 681-689, 2017.
- ANSARI, M. A. et al. Protective effect of quercetin in primary neurons against Abeta (1-42): relevance to Alzheimer's disease. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 20, n. 4, p. 269-75, 2009.
- ANTUNES-RICARDO M., MORENO-GARCÍA B. E., GUTIÉRREZ-URIBE J. A., ARÁIZ-HERNÁNDEZ D., ALVAREZ M. M., SERNA-SALDIVAR S. O. Induction of apoptosis in colon cancer cells treated with isorhamnetin glycosides from *Opuntia ficus-indica* pads. **Plant Foods Hum Nutr**. 2014 Dec;69(4):331-6.
- ARMELIN, H. A., GAMBARINI, A. G., ARMELIN M. C. S. Pituitary fibroblast growth factors and the growth of rat c6 glial cell variants. **Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation**, n. 9, p. 987-996, 1982.
- AUGUSTE, P. et al. Inhibition of fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor activity in glioma cells impedes tumor growth by both angiogenesis-dependent and independent mechanisms. **Cancer Research**, n. 61, p. 1717-1726, 2001.
- BADKE, G. L. et al. Glioblastoma multiforme em idosos: uma revisão sobre seu tratamento com ênfase na abordagem cirúrgica. **Arquivos Brasileiros de Neurocirurgia**, v. 33, p. 45 – 51, 2014.
- BARRETO, R. L.; CORREIA, C. R. D. Óxido nítrico: propriedades e potenciais usos terapêuticos. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1046-1054, 2005.
- BEAR, M. F.; PARADISO, M. A.; CONNORS, B. W. **Neurociências: desvendando o sistema nervoso**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 974 p.
- BELLINTANI, M. C. **Avaliação da atividade imunomoduladora de fisalinas isoladas de *Physalis angulata* L. em macrófagos ativadas e no choque endotóxico**. 2002. Dissertação

(Mestrado em Patologia Experimental). Universidade Federal da Bahia / CPqGM / FIOCRUZ, Salvador.

BENDA, P. et al. Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. **Science**, v. 161, p. 370 – 371, 1968.

BENDER A. M.; COLLIER L. S.; RODRIGUEZ F. J. et al. Sleeping beauty-mediated somatic mutagenesis implicates CSF1 in the formation of high-grade astrocytomas. **Cancer Research**, n. 70, p. 3557-3565, 2010.

BING G. et al. Cografts of adrenal medulla with C6 glioma cells in rats with 6-hydroxydopamine-induced lesions. **Neuroscience**, n. 34, p. 687-697, 1990.

BISPO DA SILVA, A. P. L. et al. The flavonoid rutin and its aglycone quercetin modulate the microglia inflammatory profile improving antiglioma activity. **Brain, Behavior, and Immunity**, n. 85, p. 170-185, mar. 2020.

BISPO DA SILVA, A., P. L. The flavonoid rutin modulates microglial/macrophage activation to a CD150/CD206 M2 phenotype. **Chemico-Biological Interactions**, n. 25, v. 274, p. 89-99, 2017.

BRANCH, L. C.; SILVA, M. D. Folk medicine of Alter do Chão, Pará, Brazil. **Acta Amazon**, n. 13, p. 737-797, 1983.

BUSCH, C. et al. Anti-proliferative activity of hop-derived prenylflavonoids against human cancer cell lines. **Wiener Medizinische Wochenschrift**, n. 165, v. 11-12, p. 258-261, 2015.

CAI, J. et al. Generation of oligodendrocyte precursor cells from mouse dorsal spinal cord independent of Nkx6 regulation and Shh signaling. **Neuron**, n. 45, v. 1, p. 41-53, 2005.

CÁRDENAS, J. Progress in chemistry of organic natural products. **Springer-Verlag**, v. 63, 1994.

CAROCHO M.; FERREIRA I. C. The role of phenolic compounds in the fight against cancer: a review. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 8, p. 1236-58, oct. 2013.

CASTIGLI, E. et al. GL15 and U251 glioblastoma-derived human cell lines are peculiarly susceptible to induction of mitotic death by very low concentrations of okadaic acid. **Oncology Reports**, v.15, p. 463-470, 2006.

CERQUEIRA N. F.; YOSHIDA W. B. Óxido nítrico: revisão. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 17, n. 6, nov-dez. 2002.

CHAVES, A. C.; SCHUCH, M.; W. ERIG, A. C. Estabelecimento e multiplicação in vitro de *Physalis peruviana* L. Ciência e agrotecnologia. **Lavras**, v. 29. n. 6. p. 1281-1287, nov-dez. 2005.

CHIANG, H. C. et al. Antitumor agent, physalin F from *Physalis angulata* L. **Anticancer Research**, v. 12, n. 3, p. 837-43, mai-jun 1992a.

CHIANG, H. C.; JAW, S. M.; CHEN, C. F. Inhibitory effects of Physalin B and Physalin F on Various Human Leukemia Cells in vitro. **Anticancer Research**, v. 12, n. 4, p. 1155-1162, 1992b.

CHOI, E. M.; HWANG, J. K. Investigations of anti-inflammatory and antinociceptive activities of Piper cubeba, *Physalis angulata* and *Rosa hybrida*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, p. 171-175, 2003.

COELHO, P. et al. The flavonoid apigenin from *Croton betulaster* Mull inhibits proliferation, induces differentiation and regulates the inflammatory profile of glioma cells. **Anticancer Drugs**, v. 27, n. 10, p. 960-969, 2016.

COHEN J. D.; ROBINS H. I.; JAVID M. J. Radiosensitization of C6 glioma by thymidine and 41.8 degrees C hyperthermia. **Journal of Neurosurgery**, v. 72, n. 5, p. 782-785, mai. 1990.

CONDEELIS J.; SINGER R. H; SEGALL J. E. The great escape: when cancer cells hijack the genes for chemotaxis and motility. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**. v. 21, n. 1, p. 695-718, 2005.

COLLIN, M.; MCGOVERN, N.; HANIFFA, M. Human dendritic cell subsets. **Immunology**, v. 140, n. 1, p. 22–30, 2013.

CRAGG G. M.; NEWMAN D. J. Plants as a source of anti-cancer agents. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 100, v. 1-2, p. 72-79, ago. 2005.

CROZIER, A.; CLIFFORD, M.N.; ASHIHARA, H. **Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet**. Blackwell Publishing: Oxford, 2006.

DAMU, A. G. et al. Isolation, structures, and structure cytotoxic activity relationships of withanolides and physalins from *Physalis angulata*. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 1146–1152. 2007.

DIX A. R.; BROOKS W. H.; ROSZMAN T. L. et al. Immune defects observed in patients with primary malignant brain tumors. **Journal of Neuroimmunology**, v. 100, p. 216-232, 1999.

DING L.L., ZHANG J.J., DOU W. Effects of isorhamnetin on CYP3A4 and herb-drug interaction. *Yao Xue Xue Bao* 2012;47:1006-10.

DOU W., ZHANG J., LI H., KORTAGERE S., SUN K., DING L., REN G., WANG Z., MANI S. Plant flavonol isorhamnetin attenuates chemically induced inflammatory bowel disease via a PXR-dependent pathway. **J Nutr Biochem**. 2014 Sep;25(9):923-33.

EL KHOURY, J. Neurodegeneration and the neuroimmune system. **Nature Medicine**. v. 16, p. 1369-1370, 2010.

FARIA, A.; MATEUS, N.; CALHAU, C. Flavonoid transport across blood-brain barrier: Implication for their direct neuroprotective actions. **The journal of nutrition, health & aging**, v. 1, p. 89–97, 2012.

FELLER, L.; ALTINI, M.; LEMMER, J. Inflammation in the context of oral cancer. **Oral Oncology**., v. 49, n. 9, p. 887–892, 2013.

FENSTERMAKER R. A. et al. The effect of epidermal growth factor receptor (EGFR) expression on in vivo growth of rat C6 glioma cells. **Leukemia**, v. 1, p. 106-112, 1995.

FONTANA A.; KRISTENSEN F.; DUBS R. et al. Production of prostaglandin E and interleukin-1 like factor by cultured astrocytes and C6 glioma cells. **The Journal of Immunology**, v. 129, p. 2413-2419, 1982.

FORMICA, J. V.; REGELSON, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, p. 1061-1080, 1995.

FREITAS, L. S. **Avaliação de diferentes compostos em culturas de células gliais de rato infectadas com Neospora caninum**. 2019. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador.

FUMAGALI E. et al. Produção de Metabólitos Secundários em Cultura de Células e Tecidos de Plantas: O Exemplo dos Gêneros Tabernaemontana e Aspidosperma. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa. v. 18. n. 4. 2008.

GABOURY J. et al. Nitric oxide prevents leukocyte adherence: role of superoxide. **American Physiological Society Journal**, v. 265, p. 862-867, 1993.

GINHOUX, F. et al. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. **Science**, v. 330, p. 841–845, 2010.

GOMES, F. C. A. et al. Glia: dos velhos conceitos às novas funções de hoje e as que ainda virão. **Estudos avançados**. v. 27, n. 77, 2013.

GIAKOUMETTIS D.; KRITIS A.; FOROGLOU N. C6 cell line: the gold standard in glioma research. **Hippokratia**, v. 22, n. 3, p. 105-112, jul-set. 2018.

GIERYNG, A. et al. Immune microenvironment of experimental rat C6 gliomas resembles human glioblastomas. **Scientific Reports**, v. 7, n. 17556, p. 1-14, 2017.

GREENE, L. A.; TISCHLER, A.S. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 73, p. 2424–2428. 1976.

GROBBEN, B.; DE DEYN, P. P.; SLEGGERS, H. Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion. **Cell and Tissue Research**, v. 310, n. 3, p. 257–270, 2002.

GROSSO, P. et al. The use of flavonoids in central nervous system disorders. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 37, p. 4694-4719, 2013.

GUIMARÃES, E. T. et al. Activity of physalins purified from *Physalis angulata* in vitro and in vivo models of cutaneous leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, p. 84-87, 2009.

GULLICK W. J. (1991). Prevalence of aberrant expression of the epidermal growth factor receptor in human cancers. **British medical bulletin**, v. 47, n. 1, p. 87-98, 1991.

GUSTAFSON, M. P. et al. Systemic immune suppression in glioblastoma: the interplay between CD14 HLA-DR<sup>lo</sup>/neg monocytes, tumor factors and dexamethasone. **Neuro-Oncology**, v. 12, n. 7, p. 631-644, 2010.

HANAHAN, D.; WEINBERG R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, mar. 2011.

HAO, C. et al. Cytokine and cytokine receptor mRNA expression in human glioblastomas: Evidence of Th1, Th2 and Th3 cytokine dysregulation. **Acta Neuropathologica**, v. 103, n. 2, p. 171–178, 2002.

HANIF, F.; MUZAFFAR, K.; PERVEEN, K. et al. Glioblastoma multiforme: a review of its epidemiology and pathogenesis through clinical presentation and treatment. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 18, p. 3-9, 2017.

HE, F.; SUN, Y. E. Glial cells more than support cells? **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 4, p. 661-5, 2007.

HILDEBRAND, J. et al. Management of malignant brain tumors. **European Neurology**, n. 38, p. 238-253, 1997.

HOLLAND, E. C. Glioblastoma multiforme: the terminator. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, p. 6242-44, 2000.

HSEU, Y. C. Inhibitory effects of *Physalis angulata* on tumor metastasis and angiogenesis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135, n. 3, p.762-71, jun. 2011.

HSIEH, W. T. et al. *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.

HERCULANO-HOUZEL, S.; LENT, R. Isotropic fractionator: a simple, rapid method for the quantification of total cell and neuron numbers in the brain. **Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 10, p. 2518-21, mar. 2005.

HU J., ZHANG Y., JIANG X., ZHANG H., GAO Z., LI Y., FU R., LI L., LI J., CUI H., GAO N. ROS-mediated activation and mitochondrial translocation of CaMKII contributes to Drp1-dependent mitochondrial fission and apoptosis in triple-negative breast cancer cells by isorhamnetin and chloroquine. **J Exp Clin Cancer Res.** 2019 May 28;38(1):225.

HULKOWER K. I.; HERBER R. L. Cell migration and invasion assays as tools for drug discovery. **Pharmaceutics**, v. 3, n. 1, p. 107-24, mar. 2011.

HUNZIKER, A. T. **Genera Solanacearum. Rugell:** A.R.G. Gantner Verlag, 2001. 500 p.

INCA. **ABC do câncer:** abordagens básicas para o controle do câncer. Rio de Janeiro, 2011.

INCA. **Estimativa 2014** - incidência de câncer no brasil. Rio de Janeiro, 2014.

INCA. **Estimativa 2018** – Incidência de câncer no Brasil. Instituto Nacional de câncer. José Alencar Gomes da Silva, 2017.

INCA. **Estimativa 2020** - incidência de câncer no Brasil. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2019

JOVČEVSKA I.; KOČEVAR N.; KOMEL R. Glioma and glioblastoma - how much do we (not) know? **Molecular and Clinical Oncology**, v. 1, n. 6, p. 935-941, ago. 2013.

KANDEL, E. R. **Princípios de Neurociências.** 5 ed. Porto Alegre: Ed. Mc Hill, 2014.

KIRSCH, M. et al. Angiostatin suppresses malignant glioma growth in vivo. **Cancer Research**, v. 58, p. 4654-4659, 1998.

KREBS, C. et al. **Neurociências:** ilustrada. Porto Alegre: Artmed, 2013. 433 p.

KUMAR, R.; KAMDAR D.; MADDEN, L. Th1/Th2 cytokine imbalance in meningioma, anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme patients. **Oncology Reports**, v.15, n. 6, p.1513-1516, 2006.

KUO PC, SCHROEDER RA. The emerging multifaceted roles of nitric oxide. **Annals of Surgery**, v. 221, n. 3, p. 220-235, 1995.

KUTI J. O. Antioxidant compounds from four Opuntia cactus pear fruit varieties. **Food Chem** 2004;85:527–33.

KUPPNER, M.; HAMOU, M.; SAWAMURA, Y. et al. Inhibition of lymphocyte function by glioblastoma-derived transforming growth factor beta 2. **Journal of Neurosurgery**, v. 71, n. 2, p. 211-217, 1989.

LACOUTURE, M. E.; MELOSKY, B. L. Cutaneous reactions to anticancer agents targeting the epidermal growth factor receptor: a dermatology-Oncology perspective. **Skin Therapy Letter**, v. 12, n. 6, p. 1–5, 2007.

LAWSON, L. J et al. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. **Neuroscience**, v. 39, n. 1, p. 151–170, 1990.

LENT, R. **Cem bilhões de neurônios?** Conceitos fundamentais de neurociência. 2 ed. Rio de Janeiro: Ateneu, 2010. 786 p.

LI, Y. F.; FU, L. W. Antitumoral effects of annonaceous acetogenins. **Chinese Pharmacological Bulletin**, v. 20, n. 3, p. 245-247, 2004.

LI, G. et al. Tumor microenvironment in treatment of glioma. **Open Medicine**, v. 12, n. 1, p. 247-251, 2017.

LIANG, C. C.; PARK, A. Y.; GUAN, J. L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 329-33, 2007.

LOPES, D. C. D. X. P. et al. Atividades antimicrobiana e fototóxica de extratos de frutos e raízes de *Physalis angulata* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 206-210, abr-jun. 2006.

LOUIS D. N. et al. **WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System**. IARC: Lyon. 2007.

LU, C.; SHERVINGTON, A. Chemoresistance in gliomas. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 312, n. 1-2, p. 71 – 80, 2008.

MAHALEY, M. S.; BROOKS, W. H.; ROSZMAN, T. L. et al. Immunobiology of primary intracranial tumors. Part 1: studies of the cellular and humoral general immune competence of brain-tumor patients. **Journal of Neurosurgery**, v. 46, n. 7, p. 467-476, 1977.

MACHADO, A. B. M.; HAERTEL, L. M. **Neuroanatomia funcional**. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 2014. 352 p.

MAGALHÃES, H. I. et al. In-vitro and in-vivo antitumour activity of physalins B and D from *Physalis angulata*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 58, n. 2, p. 235-41, 2006.

MANTOVANI, A. et al. Tumour immunity: effector response to tumour and role of the microenvironment. **Lancet**, v. 371, n. 9614, p. 771-783, 2008.

MENEZES, M. S. **Papel do jaspamídeo na dinâmica do citoesqueleto de actina das células de melanoma**: relação com migração e invasão. 2011. 77 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

MIER-GIRALDO, H. et al. Cytotoxic and immunomodulatory potential activity of *Physalis peruviana* fruit extracts on cervical cancer (HeLa) and fibroblast (L929) cells. **Journal of Evidence-based Complementary & Alternative Medicine**, v. 22, n. 4, p. 777-787, 2017.

MILLAUER, B. Glioblastoma growth inhibited in vivo by a dominant-negative Flk-1 mutant. **Nature**, v. 367, n. 6463, p. 576-579, 1994.

MOSCHETTO, A. B. **Novidade no pomar**. Edição 236 - jun/05. Disponível em: <[http://revistagloborural.globo.com/EditoraGlobo/componentes/article/edg\\_article\\_print/1,3916,972755-1641-1,00.html](http://revistagloborural.globo.com/EditoraGlobo/componentes/article/edg_article_print/1,3916,972755-1641-1,00.html)>.

MUNIZ, J. et al. Conduction systems for Physalis production in southern Brazil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 3, p. 830-838, 2011.

NAKAMURA, T.; LIPTON, S.A. Cell death: protein misfolding and neurodegenerative diseases. **Apoptosis**, v. 14, n. 4, p.455-468, 2009.

NATSUME, A., YOSHIDA, J. Gene therapy for high-grade glioma. **Cell Adhesion & Migration**, v. 2, n. 3, p. 186-191, 2008.

OZEKI, T. et al. Treatment of Rat Brain Tumors Using Sustained-Release of Camptothecin from Poly(lactic-co-glycolic acid) Microspheres in a Thermoreversible Hydrogel. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 58, n. 9, p. 1142-1147, 2010.

PALUCKA, K.; BANCHEREAU, J. Cancer immunotherapy via dendritic cells. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 4, p. 265–277, 2012.

PAN, X.; WELTI, R.; WANG, X. Quantitative analysis of major plant hormones in crude plant extracts by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. **Nature Protocols**, v. 5, n. 6, p. 986-992, jun. 2010.

PARNEY, I. F., WALDRON, J. S., & PARSA, A. Flow cytometry and in vitro analysis of human glioma-associated macrophages. **Journal of Neurosurgery**, v. 110, n. 2, p. 572–582, 2011.

PAUKERT, M.; BERGLES, D. E. Synaptic communication between neurons and NG2+ cells. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 16, n. 5, p. 515-21, out. 2006.

PAYNE, D.; KUBES, P. Nitric oxide donors reduce the rise in reperfusion-induced intestinal mucosal permeability. **American Physiological Society Journal**, v. 265, n. 1, p. G189–G195, 1993.

PINTO, L. W.; CHIMELLI, L. Componente oligodendroglial e neuronal em glioblastomas: possível relação com o prognóstico. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 62, n. 4, p. 1074-1078, 2004.

RANSOM, B. R.; KETTENMANN, H. Electrical coupling, without dye coupling, between mammalian astrocytes and oligodendrocytes in cell culture. **Glia**, v. 3, n. 4, p. 258-266, 1990.

RIBEIRO, I. M. et al. Physalis angulata L. antineoplastic activity, in vitro, evaluation from it's stems and fruit capsules. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, Supl. 1, p. 21-23, 2002.

ROITT, I. M.; DELVES, P. J. **Fundamentos de Imunologia**. 12 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2013. 544 p.

ROSA, V. M. **Efeito da dieta contendo rutina sobre a inflamação, apoptose e a resposta antioxidante em jundiás (*Rhamdia quelen*) infectados com *Aeromonas hydrophila***. 2019. 83 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Farmacologia, Rio Gande do Sul.

ROSENFELD, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica: nova combinação dos componentes do May Grunwald e do Giemsa num só corante de emprego prático. **Memórias do Instituto Butantã**, v. 20, p. 329–335, 1947.

RUAN Y., HU K., CHEN H. Autophagy inhibition enhances isorhamnetin-induced mitochondria-dependent apoptosis in non-small cell lung cancer cells. **Mol Med Rep**. 2015 Oct;12(4):5796-806.

RÜNGELER, P. Inhibition of transcription factor NF- $\kappa$ B by sesquiterpene latones: a proposed molecular mechanism of action. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 11, p. 2342-2352, 1999.

SAADEH, F. S.; MAHFOUZ, R.; ASSI, H. I. EGFR as a clinical marker in glioblastomas and other gliomas. **The International Journal of Biological Markers**, v. 33, n. 1, p.22-32, jan. 2018.

SALCMAN, M. **Epidemiology and factors affecting survival**. In malignant cerebral Glioma. Neurosurgical topic series. Apuzzo MLJ. American Association of Neurological Surgeons, Park Ridge, Ill pp 95-110, 1990.

SALEH, M.; STACKER, S. A.; WILKS, A. F. Inhibition of growth of C6 glioma cells in vivo by expression of antisense vascular endothelial growth factor sequence. **American Association for Cancer Research**, v. 56, n. 2, p. 393-401, 1996.

SANTOS, B. L. et al. Antiproliferative, proapoptotic and morphogenic effects of the flavonoid rutin on human glioblastoma cells. **Food Chemistry**, v. 127, n. 2, p. 404-411, 2011.

SANTOS, B. L. et al. Flavonoids suppress human glioblastoma cell growth by inhibiting cell metabolism, migration, and by regulating extracellular matrix proteins and metalloproteinases expression. **Chemico-Biological Interactions**, v. 242: 123-138, 2015.

SAUD S.M1., YOUNG M. R., JONES-HALL Y. L., et al. Chemopreventive activity of plant flavonoid isorhamnetin in colorectal cancer is mediated by oncogenic Src and  $\beta$ -catenin. **Cancer Res**. 2013; 73:5473-84.

SAWAMURA, Y.; DISERENS A. C.; DE TRIBOLET, N. In vitro Prostaglandin E2 production by glioblastoma cells and its effect on interleukin-2 activation of oncolytic lymphocytes. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 9, n. 2, p. 125-130, 1990.

SCHREIBER, R. D.; OLD, L. J.; SMYTH, M. J. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. **Science**, v. 331, n. 6024, p. 1565-1570, 2011.

SCHNEIDER T, MAWRIN C, SCHERLACH C, SKALEJ M, FIRSCHING R. Gliomas in adults. **Deutsches Ärzteblatt International**, v. 107, n. 45, p. 799-807, 2010.

SCHWARTZBAUM, J. A.; FISHER, J. L.; ALDAPE, K. D.; WRENSCH, M. Epidemiology and molecular pathology of glioma. **Nature Clinical Practice Neurology**, v. 2, n. 9, p. 494-516, 2006.

SIEPL, C.; BODMER, S.; FREI, K. et al. The glioblastoma derived T-cell suppressor factor/transforming growth factor beta 2 inhibits T-cell growth without affecting the interaction of interleukin-2 with its receptor. **European Journal of Immunology**, v. 18, n. 4, p. 593-600, 1988.

SILVA, K. N.; AGRA, M. F. Estudo Farmacobotânico Comparativo entre *Nicandra Physalodes* e *Physalis angulata* (Solanaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 15, n. 4, 2005.

SNYDER SH, BREDT DS. Biological roles of nitric oxide. **Scientific American**, v. 266, n. 5, p. 68-71, mai. 1992.

SOARES, M. B.; BELLINTANI, M. C.; RIBEIRO, I. V.; TOMASSINI, T. C. B.; SANTOS, R. R. Inhibition of macrophage activation and lipopolysaccharide-induced death by seco-steroids purified from *P. angulata* Lin. **European Journal of Pharmacology**, v. 459, n. 1, p.107-112, 2003.

SOARES M. B. P. et al. Physalins B, F and G, seco-steroids purified from *Physalis angulata* L., inhibit lymphocyte function and allogeneic transplant rejection. **International Immunopharmacology**, v. 6, n. 3, p. 408-414, 2006.

SOFFIETTI, R.; RUDA, R.; TREVISAN, E. New chemotherapy options for the treatment of malignant Gliomas. **Anticancer Drugs Review**, v. 6, n. 18, p.621-32, 2007.

SOLIMAN, K. F., MAZZIO, E. A. In vitro attenuation of nitric oxide production in C6 astrocyte cell culture by various dietary compounds. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 218, n.4, p. 390-397, 1998.

SPANOA, D.; HECKC, C.; DE ANTONELLISA, P.; CHRISTOFORI, G.; ZOLLOA, N. Molecular networks that regulate cancer metastasis. **Seminars in Cancer Biology**, v. 22, n. 3, p. 234-249, 2012.

STOCKHAUSEN, M. T. et al. Differentiation of glioblastoma multiforme stem-like cells leads to downregulation of EGFR and EGFRvIII and decreased tumorigenic and stem-like cell potential. **Cancer Biology & Therapy**, v. 15, n. 2, p. 216-224, 2014.

TAMAKI, M.; MCDONALD, W.; DEL MAESTRO, R. F. The importance of cell density in the interpretation of growth factor effects on collagenase IV activity release and extracellular matrix production from C6 astrocytoma cells. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 39, n. 3, p. 205-216, 1998.

TENG B. S.; LU Y. H.; WANG Z. T.; TAO X. Y.; WEI D. Z. In vitro anti-tumor activity of isorhamnetin isolated from *Hippophae rhamnoides* L. against BEL-7402 cells. **Pharmacol Res.** 2006 Sep; 54(3): 186-94.

TOMASSINI, T. C. B. et al. Gênero *Physalis* – Uma Revisão Sobre Vitaesteróides. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, n. 1, 2000.

TRANCHIMAND, S.; BROUANT, S.; IACAZIO, G. The rutin catabolic pathway with special emphasis on quercetinase. **Biodegradation**, v. 21, n. 6, p. 833-59, 2010.

VANDENBERG, S. R. Current diagnostic concepts of astrocytic tumors. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**. v. 51, n. 6, p. 644-657, 1992

VANDIER, D.; RIXE, O.; BRENNER, M.; GOYETTE, A.; BESNARD, F. Selective killing of glioma cell lines using na astrocyte-specific expression of herpes simplex virus-thymidine kinase gene. **Cancer Research**, v.58, n. 20, p. 4577-4580, 1998.

WANG, H. Y et al. Identification of HMGCR as the anticancer target of physapubenolide against melanoma cells by in silico target prediction. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 43, n. 6, p. 1594-1604, jun. 2021.

WANG J. L.; QUAN Q.; JI R.; GUO X. Y; ZHANG J. M.; LI X.; LIU Y. G; Isorhamnetin suppresses PANC-1 pancreatic cancer cell proliferation through S phase arrest. **Biomed Pharmacother**. 2018 Dec;108:925-933.

WEI, J.; SU, H.; BI, Y.; LI, J.; FENG, L.; SHENG, W. Anti-proliferative effect of isorhamnetin on HeLa cells through inducing G2/M cell cycle arrest. **Exp. Ther. Med.**, 15 (4) (2018).

WESTPHAL, M.; LAMSZUS, K. Circulating biomarkers for gliomas. **Nature Reviews Neurology**, v. 11, n. 10, p. 556–566, 2015.

WU S. J. et al. Supercritical carbon dioxide extract exhibits enhanced antioxidant and anti-inflammatory activities of *Physalis peruviana*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, n. 3, p. 407-413, dez. 2006.

WU S. J. et al. Antioxidant activities of *Physalis peruviana*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 6, p. 963-966, jun. 2005.

WU, S. J. Antihepatoma activity of *Physalis angulata* and *Physalis peruviana* extracts and their effects on apoptosis in human Hep G2 cells. **Life Sciences**, v. 74, n. 16, p. 2061-2073, 2004.

XUE, H. et al. A novel tumor-promoting mechanism of IL6 and the therapeutic efficacy of tocilizumab: Hypoxia-induced IL6 is a potent autophagy initiator in glioblastoma via the p-STAT3- MIR155-3p -CREBRF pathway. **Autophagy**, v. 2, n. 7, 1129–1152, 2016.

YAN Z. et al. Expression of inducible nitric oxide synthase inhibits platelet adhesion and restores blood flow in the injured artery. **Circulation Research**, v. 79, n. 1, p. 38-44, 1996.

YANG, I. et al. The role of microglia in central nervous system immunity and glioma immunology. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 17, n. 1, p. 6-10, 2010.

YANG J. H.; KIM S. C.; SHIN B. Y.; JIN S. H.; JO M. J.; JEGAL K. H.; KIM Y. W.; LEE J. R.; KU S. K.; CHO I. J.; KIS. H. O-Methylated flavonol isorhamnetin prevents acute inflammation through blocking of NF- $\kappa$ B activation. **Food Chem Toxicol**. 2013 Sep;59:362-72.

YARDEN Y.; SLIWKOWSKI, M. X. Untangling the ErbB signalling network. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 2, n. 2, p. 127-137, 2001.

ZHANG, J. G.; KRUSE, C. A.; DRIGGERS, L. et al. Tumor antigen precursor protein profiles of adult and pediatric brain tumors identify potential targets for immunotherapy. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 88, n. 1, p. 65-76, 2008.

ZHENG, W. et al. Differentiation of Glial Cells From hiPSCs: Potential Applications in Neurological Diseases and Cell Replacement Therapy. **Front. Cellular neuroscience**, v. 12, n. 239, p. 1-63, 2018.

ZHOU, B.; ZUO, Y. X.; JIANG, R. T. Astrocyte morphology: Diversity, plasticity, and role in neurological diseases. **CNS Neuroscience and Therapeutics**, v. 25, n. 6, p. 665–673, 2019.