



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº PI 1104177-3

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: PI 1104177-3

(22) Data do Depósito: 18/07/2011

(43) Data da Publicação Nacional: 27/05/2014

(51) Classificação Internacional: A61K 31/585; A61K 36/81; A61P 25/00.

(54) Título: USO DA FIALINA E DOS EXTRATOS ETNÓLICO E AQUOSO NA PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO NEURONAIS DO GIRO DENTEADO

(73) Titular: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ. CGC/CPF: 34621748000123. Endereço: Av. Augusto Corrêa,1, Guamá, Belém, PA, BRASIL(BR), 66075900

(72) Inventor: MILTON NASCIMENTO DA SILVA; RICARDO AUGUSTO DE MELO REIS; MARA SÍLVIA PINHEIRO ARRUDA; DANILA TERESA VALERIANO ALVES; GILMARA NAZERETH TAVARES BASTOS; JOSÉ LUIZ MARTINS DO NASCIMENTO; EDILENE OLIVEIRA DA SILVA.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 18/07/2011, observadas as condições legais

Expedida em: 01/12/2020

Assinado digitalmente por:

Liane Elizabeth Caldeira Lage

Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados



Uso da Fisalina D e dos extratos etanólico e aquoso na proliferação de células-tronco neuronais do giro denteado.

A presente patente refere-se ao uso dos extratos aquoso (EA), etanólico (EE) e da substância pura Fisalina D oriunda da planta *Physalis angulata* como agentes promotores de neurogênese. Essa planta é conhecida popularmente como camapú, é encontrada em áreas tropicais da Ásia, África e Américas incluindo a floresta Amazônica.

Physalis angulata já vem sendo usada na medicina tradicional sob a forma de extratos ou infusos em vários países para fins de tratamento de diversas doenças, tais como malária, asma, hepatite, dermatite, reumatismo e gonorréia (Lin et al., 1992; Cáceres et al., 1995). Bastos e colaboradores (2006) mostraram o efeito analgésico do extrato aquoso obtido da raiz da *Physalis angulata*, aplicada em diferentes doses (10, 20, 30, 60 mg/Kg) por via intraperitoneal ou oral. Já efeitos antiinflamatórios foram demonstrados inicialmente por Choi e Hwang (2003) no modelo de inflamação de edema de pata induzido por carragenina. Esses mesmos autores usaram modelo de artrite induzida por formaldeído e modelo de alergia, com atividade antialérgica contra reação de hipersensibilidade tipo IV induzida por contato com 2,4 dinitrofluorobenzeno (DNFB). Os extratos foram testados por via oral sob a forma metanólica a partir das flores da *Physalis angulata*, em uma única dose de 200 mg/Kg. Bastos e colaboradores (2008) ao usarem o modelo experimental da bolsa de ar também mostraram o efeito antiinflamatório do extrato aquoso da raiz dessa mesma planta em diferentes doses (0,5, 1 e 5 mg/Kg) em ratos adultos através de administração intraperitoneal. Os efeitos observados foram diminuição do volume do exsudato, do número total de células, dos níveis de óxido nítrico e da inibição de PGE2 (Bastos et al. 2008). É interessante ressaltar que as doses usadas por Bastos e colaboradores estavam bem abaixo daquela usada por Choi e Hwang (2003) e foi também possível descrever os mecanismos da ação antiinflamatória da planta.

Outra ação biológica da planta foi atividade imunoduladora (Soares, et al., 2003). Nesse trabalho, os autores usaram pela primeira vez, fisalinas purificadas (B, F e G) isoladas do extrato etanólico de *Physalis angulata* em modelo de cultura de macrófagos ativadas por lipopolissacarídeo e interferon- γ . Os achados foram uma

redução substancial na produção de óxido nítrico. A fisalina **B** teve um efeito adicional ao reduzir significativamente os níveis de TNF- α , interleucina-6 e interleucina-12.

Além disso, já está descrito na literatura a propriedade antileishmanicida da fisalina B e F, inibindo o crescimento de *Leishmania amazonensis* em macrófagos infectados com este parasita. Devido a esta atividade foi realizado em Abril de 2003, junto ao Instituto Americano de propriedade intelectual (United States Patents), depósito de patente com número de processo 09417779, intitulada “Process for isolating physalins from plants and pharmaceutical compositions containing physalins” que reivindica o uso antileishmanicida. Este mesmo grupo realizou o depósito de patente no Instituto Brasileiro de Propriedade Intelectual, com número PI0404635-8, intitulada “Processo para a obtenção de esteróides seco derivados de ergostano” que reivindica o processo de obtenção de fisalinas.

Entretanto, até o momento o potencial farmacológico dessa planta sobre o sistema nervoso não foi estudado. A busca por novas classes de moléculas que tenham impacto funcional direto em processos cognitivos estão entre as prioridades da neurofarmacologia. Nosso grupo, ao realizar investigações sistemáticas *in vivo*, observou pela primeira vez um efeito neurogênico dessa planta em células-tronco hipocampais de camundongos adultos. Usamos para isso, extrato aquoso (EA), extrato etanólico (EE) e a fisalina D, que foi isolada pela primeira vez por Mulchandani em 1975. Portanto, descrevemos aqui, os métodos experimentais desenvolvidos para obtenção do efeito neurogênico do EA, EE e da fisalina D, não havendo na literatura qualquer relato desses procedimentos. O efeito observado está relacionado com a produção de células progenitoras no nicho neurogênico hipocampal de camundongos adultos.

Neurogênese é o processo pelo qual as células-tronco neuronais (CTNs), multipotentes apresentam capacidade de auto-renovação e diferenciação nos principais fenótipos celulares do SNC, como neurônios, oligodendrócitos e astrócitos (Gage, 2000). As CTNs podem ser isoladas de muitas áreas do sistema nervoso de adultos, mas em condições fisiológicas se localizam exclusivamente na zona subventricular do bulbo olfatório (Lois & Alvarez-Buylla; 1993) e na zona subgranular do giro denteado hipocampal (Zhao, 2008). É suposto que o microambiente da ZSG e ZSV apresenta diversos fatores que permitem a diferenciação e a integração destes novos neurônios

(Zhao, 2008). Relatos na literatura têm demonstrado a presença de células-tronco neurais no cérebro de mamíferos adultos na zona subventricular e no giro denteado hipocampal (Gage et al, 2002). Estas células apresentam a habilidade de proliferar e diferenciar em neurônios e glias (Ono et al., 2001). Após amadurecimento, estas células integram e formam conexões neurais. A neurogênese no hipocampo envolve um processo complexo, que ocorre no giro denteado, que se inicia com a proliferação de CTNs na ZSG, seguido da diferenciação e espontânea migração das células para a camada granular e por último a maturação com possível sobrevivência ou morte das células neurais (Eriksson et. al., 1998). No giro dentado de roedores, as células neuronais recém-formadas na ZSG migram para a camada granular, onde se diferenciam em células neuronais e aumentam suas projeções axonais para a área de CA3 hipocampal (Altman et al, 1965). Em ratos, células granulares imaturas estendem os axônios para CA3 entre 4-10 dias após o início da mitose, enquanto que o processo de maturação dessas células formadas, da proliferação na ZSG, migração para a camada granular e diferenciação em célula neuronal, leva aproximadamente 4 semanas (Cameron et al., 1993; Hastings e Gould, 1999).

No cérebro de roedores, foi feita uma abordagem quantitativa desses novos neurônios gerados e observou-se que aproximadamente nove mil novos neurônios foram gerados, o que significa dizer que ocorre um aumento de 3,3% ao mês na população de células sub-granulares no GD (Kerpermann et al., 1997), enquanto que, em cérebros de primatas adultos, estima-se que pelo menos 0,004% da população neuronal na camada de célula sub-granular são gerados por dia (Kornack & Rakic, 1999). Portanto, a taxa relativa de neurogênese em macacos adultos é 10 vezes menor do que no GD de roedores adultos (Kornack & Rakic, 1999). Em humanos adultos, a neurogênese no GD foi comprovada através da técnica de imunofluorescência para BrdU em amostras de tecido cerebral obtidas de pacientes *que morreram de* câncer. Eles usaram a técnica de BrdU para avaliar a atividade proliferativa das células hipocampais e encontraram uma forte marcação em fatias de GD. Entretanto, nesse estudo, não foi feito um estudo quantitativo que pudesse estimar a percentagem de neurônios gerados (Eriksson et al. (1998).

Na ZSG, os progenitores hipocampais encontram-se opostos a camada de células granulares que inclui neurônios maduros e imaturos, dentro deste mesmo microambiente há também astrócitos, oligodendrócitos e outros tipos de neurônios

(Zhao et al., 2008). Os astrócitos do hipocampo desempenham um papel fundamental na neurogênese da ZSG, promovendo a diferenciação dos progenitores neurais e a integração *in vitro* desses novos neurônios do hipocampo de ratos adultos (Song et al., 2002). Além disso, neurogênese em adultos pode ser regulada por diversos fatores fisiológicos e patológicos, tais como estado emocional, alterações patológicas e psicológicas (Christie & Cameron, 2006; Elder *et. al.*, 2006). Em modelos de neuroinflamação induzida pela administração periférica da endotoxina bacteriana lipopolissacarídeo (LPS) em camundongos adultos, observa-se uma intensa ativação de células microgлияis, que liberam citocinas proinflamatórias e promovem uma redução da neurogênese no giro denteado hipocampal, além de inibir a sobrevivência de células-tronco (Monje et al., 2003; Bastos et al., 2008). A neurogênese também pode ser influenciada pelo estado de humor do indivíduo, em situações como a depressão, existe uma redução no número de células em proliferação na zona subgranular do giro denteado. Em 1992, Gould e colaboradores, mostraram pela primeira vez que a divisão celular no giro denteado de ratos adultos é suprimida devido ao aumento no nível de corticosteróides, sendo frequentemente elevado em animais que sofreram estresse e em pacientes com depressão. Mudanças morfológicas no hipocampo também têm sido demonstradas em resposta ao estresse, incluindo a atrofia e perda de neurônios piramidais de CA3 após a exposição ao estresse físico ou psicológico (McEwen, 1999). O uso de medicamentos antidepressivos, entre eles a fluoxetina, revertem ou previnem a redução da neurogênese induzida por estresse (Hen et al., 2006; Encinas et al., 2006; Malberg et al., 2000). Desta forma, é possível que a modulação da proliferação, migração e diferenciação de células-tronco neuronais seja uma estratégia muito promissora em manter a plasticidade cerebral e a preservação da capacidade de memória em pacientes com déficit de memória senil. Adicionalmente, existe uma progressiva morte neuronal e uma redução na capacidade regenerativa do cérebro em doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson. Isso parece ocorrer devido a redução na proliferação celular e formação de novos neurônios no giro denteado (Lindvall & Kokaia, 2006).

Hoje, existe uma busca incessante por novos fármacos que aumentem a cognição, ou seja, substâncias que influenciam e expandam a atividade cerebral, tais como aprendizagem e memória. Essas substâncias devem ser de origem natural ou pelo menos similares as substâncias naturais encontradas endogenamente. Outro aspecto

importante é que essas drogas não sejam ilícitas e nem provoquem dependência química. Essa patente descreve os procedimentos experimentais da physalina D e seus extratos aquosos e etanólicos na promoção e restauração da neurogênese no nicho neurogênico hipocampal e sua interferência positiva em áreas relacionadas com a aprendizagem e memória.

Camundongos machos adultos, BALBc, com 6 a 8 semanas que foram mantidos em caixas à temperatura ambiente; água e comida *ad libitum* e ciclo de claro/escuro de 12 horas. Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com o guia de cuidados animais para laboratório do comitê de ética do ICB/UFPA.

10 A extração da FD se deu a partir das partes aéreas da *Physalis angulata* secas em estufa com temperatura de 100°C, por dois dias, sendo posteriormente trituradas em moinho, obtendo-se cinco quilogramas de material seco e moído. Quatro quilogramas deste material foram submetidos a três extrações por maceração com hexano por 24 horas, seguido de filtração e evaporação do solvente em evaporador rotativo. Em
15 seguida, a partir do resíduo, foi realizada uma extração por Soxhlet com álcool etílico em sete ciclos de 8 horas. O solvente foi eliminado em evaporador rotativo obtendo 70 gramas do extrato etanólico (EE). Cento e cinquenta gramas de material seco e triturado foram colocados em 700 mililitros de água e aquecidos até 100°C por 10 minutos. A solução resultante foi liofilizada rendendo 2,7 gramas do material liofilizado (EA). Os
20 extratos EA e EE foram estocados ao abrigo da luz e da umidade.

Para a obtenção de FD purificada, 50 gramas do EE foram fracionadas em Coluna Cromatográfica de sílica gel, utilizando-se um litro das seguintes misturas de solventes: Hexano/Acetato de etila 90:10 (F1); Hexano/Acetato de etila 70:30 (F2); Hexano/Acetato de etila 50:50 (F3); Acetato de etila 100% (F4); Acetato de
25 etila/Metanol 80:20 (F5) e Metanol 100% (F6), obtendo-se, após evaporação dos solventes 71 mg de F1; 237 mg de F2; 950 mg de F3; 6,0 g de F4; 278 mg de F5 e 30 g de F6. A FD foi obtida a partir de F5 através de fracionamento por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, usando uma coluna de fase reversa C18 e fase móvel composta por uma mistura de água e acetonitrila (75:25) com vazão de 4,7 ml/minuto.

30 Para análise proliferativa de células-tronco hipocampais os animais receberam uma dose de 50mg/kg de BrdU por via intraperitoneal e diferentes doses do extrato de *P. angulata*. Estes animais foram sacrificados com 24 horas e 7 dias após a sua

administração. Este tempo é equivalente ao período de proliferação e diferenciação das células-tronco hipocampais, respectivamente. Bromodeoxiuridina (BrdU) é um análogo sintético da timidina que durante a fase-S do ciclo celular incorpora-se ao DNA da célula. O número total de células BrdU-positivas foram quantificadas na camada subgranular do hipocampo que é definida pela área (10 μ m-dois corpos celulares) entre o hila e a camada granular hipocampal em cada corte (Bastos et al, 2008).

Após os animais serem eutanizados, estes foram perfundidos com solução salina seguido de paraformoldeído (PFA) a 4%. Os cérebros foram dissecados e pós-fixados a 4°C em PFA a 4% por 12 horas e depois crioprotetidos em sacarose a 20%. Os cérebros foram fatiados a 40 μ m em criostato. Para a imunohistoquímica de BrdU, as fatias foram tratadas com HCl (2N) a 37°C por 20 min, seguido da neutralização com Tampão de Borato de Sódio (0.15 M, pH 8.5) por 10 min. Após serem lavados com Tampão fosfato salina (PBS), bloqueadas com solução de BSA 2,5% por 2 horas em seguida as fatias foram incubadas com anticorpo primário anti-BrdU por 12 horas em temperatura ambiente. Em seguida as amostras foram incubadas com anticorpo secundário conforme a especificidade do anticorpo primário utilizado.

Os hipocampos de ratos wistar (P1-P5) foram dissecados e dissociados mecanicamente. As células viáveis foram semeadas em placas de 4 poços (NUNC) na densidade de 10⁶ células/poço contendo meio de cultura Neurobasal sem soro ou fator de crescimento. Após 24 horas as células foram lavadas e no grupo tratado foi adicionado FD, enquanto que no grupo controle foi adicionado 10ng/ml de EGF e FGF-2. As culturas foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico.

Com o intuito de determinar uma curva dose resposta dos extratos de *Physalis angulata* e da FD na área neurogênica do Hipocampo, os animais receberam uma única dose de 50mg/kg de BrdU por via intraperitoneal e foram sacrificados com 24 horas após a administração de EA. As doses usadas foram 0,1; 1 e 5 mg/Kg. Houve um aumento significativo do número de células BrdU-positivas no giro denteado nos grupos tratados em relação ao grupo controle [Controle, 92.3 \pm 24.2 (n=9); EA 0,1mg/Kg, 160.7 \pm 21.4 (n=4); EA 1mg/Kg, 310.5 \pm 4.6 (n=4); e 5mg/Kg 519 \pm 27.7 (n=4), $p<0,05$]. Os resultados indicam que o extrato apresenta efeito proliferativo sobre as CTNs no giro

denteado do hipocampo de camundongos adultos, sendo a dose que apresentou maior eficácia foi de 5 mg/Kg.

Foi realizada também uma análise qualitativa das células marcadas para BrdU no giro denteado de camundongos adultos por microscopia de fluorescência. Nos animais que receberam a dose de 0,1 mg/Kg foi possível observar a formação de aglomerado de células localizados apenas no giro denteado. Este aglomerado é uma das principais características do processo de neurogênese que se chama neurosfera. No grupo que recebeu a dose de 5 mg/Kg, as células BrdU-positivas aparecem distribuídas ao longo de todo o giro denteado hipocampal e também foi observado a formação de aglomerados de células. No grupo controle, foi observado imunomarcção, mas em um número reduzido de células BrdU-positivas.

Para ratificar os resultados qualitativos obtidos anteriormente, usamos Hoescht, um marcador fluorescente de núcleo celular, para ver se houve ou não uma sobreposição das imagens de células marcadas e formadas no giro denteado nos diferentes grupos controle e experimental. A dupla marcação (BrdU e Hoescht) confirma a presença de novas células no Hipocampo.

É interessante ressaltar que os extratos utilizados aumentaram o número de células BrdU positivas no giro denteado hipocampal atuando única e exclusivamente na ZSG, região do giro denteado localizada entre o hilo e a camada de células granulares que corresponde ao local de proliferação de CTNs que se dividem e migram para a camada de células granulares. No mesmo experimento, quantificamos o número de células BrdU positivas em todas as sub-regiões do giro denteado hipocampal (zona sub-granular, camada de células granulares, molecular e hilo) e comparamos a capacidade proliferativa dos extratos sobre as outras regiões do hipocampo. Os resultados mostraram que os extratos ou a substância purificada atuam somente no nicho neurogênico e não produzem proliferação ectópica, ou seja, a presença de células fora da camada sub-granular. A proliferação ectópica é considerada uma característica patológica, que não foi o caso desse trabalho.

Para determinar se o EA na dose de 5mg/Kg aumenta o número de células BrdU positivas no giro denteado durante o período de diferenciação das CTNs, camundongos adultos foram sacrificados 7 dias após a administração de BrdU. Observamos que o extrato promoveu um aumento significativo no número de células BrdU-positivas

quando comparado com o grupo controle [controle $98,75 \pm 7,2$ (n=4) e 5 mg/Kg; $130,66 \pm 16,8$ (n=4)].

Novamente foi realizada uma análise qualitativa das células marcadas para BrdU nesse grupo de animais. Nos animais que foram tratados com 5mg/Kg constatamos a formação de um aglomerado de células BrdU-positivas e a presença destas exclusivamente na ZSG do giro dentado do hipocampo, enquanto que no grupo controle o número de células marcadas estava reduzido.

Em seguida, foram realizados experimentos *in vitro*, com a substância purificada FD. Para este experimento, células hipocâmpais foram expostas à $10 \mu\text{M}$ de FD por 24 horas e em seguida as células foram imunomarcadas com anticorpo que evidencia a presença de células-tronco progenitoras, nestina. FD aumentou o número de células nestina-positivas presentes na cultura. Esses resultados mostram que células tronco hipocâmpais estão se diferenciando em células progenitoras. Desta forma nossos resultados demonstram que EE, EA e FD apresentam atividade neurogênica em modelo *in vivo e in vitro* e, portanto, apresentam moléculas bioativas que são candidatas a promoverem a restauração da neurogênese no nicho neurogênico hipocâmpal.

REIVINDICAÇÕES

Uso da Fisalina D e dos extratos etanólico e aquoso na proliferação de células-tronco neuronais do giro denteado reivindica os seguintes produtos:

1. **Uso da Fisalina D e dos extratos etanólico e aquoso, caracterizado por ser para a preparação de um medicamento para tratar doença neurodegenerativa e/ou Alzheimer e/ou demências senis que promovam déficit de memória e/ou morte de neurônios hipocampais.**
2. **Uso da Fisalina D e dos extratos etanólico e aquoso na proliferação de células tronco neurais do giro denteado de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ser núcleo de partida para a transformação de novas moléculas com a atividade neurogênica para tratar doença neurodegenerativa e/ou Alzheimer e/ou demências senis que promovam déficit de memória e/ou morte de neurônios hipocampais.**
3. **Uso da Fisalina D e dos extratos etanólico e aquoso na proliferação de células tronco neurais do giro denteado, de acordo com a reivindicação 1 e 2 caracterizado por incorporar integralmente em formas farmacêuticas relativos ao uso como formas farmacêuticas com efeito neurogênico para tratar qualquer doença neurodegenerativa e/ou Alzheimer e/ou demências senis que promovam déficit de memória e/ou morte de neurônios hipocampais.**
4. **Uso da Fisalina D e dos extratos etanólico e aquoso na proliferação de células tronco neurais do giro denteado, de acordo com a reivindicação 1, 2 e 3 caracterizado por possuir ação sinérgica com outra molécula ativa de modo a potencializar o efeito neurogênico para tratar qualquer doença neurodegenerativa e/ou Alzheimer e/ou demências senis que promovam déficit de memória e/ou morte de neurônios hipocampais.**
5. **Uso da Fisalina D e dos extratos etanólico e aquoso na proliferação de células tronco neurais do giro denteado de acordo com a reivindicação 1, 2, 3 e 4, caracterizado por possuir efeitos e mecanismos com atuação em células-tronco em geral para tratar doença neurodegenerativa e/ou Alzheimer e/ou demências senis que promovam déficit de memória e/ou morte de neurônios hipocampais.**

6. **Uso da Fisalina D e dos extratos etanólico e aquoso na proliferação de células tronco neurais do giro denteado**, de acordo com a reivindicação 1, 2, 3, 4 e 5, **caracterizado por** ser fatores de crescimento em nichos neurogênicos e não neurogênicos **para tratar qualquer doença neurodegenerativa e/ou Alzheimer e/ou demências senis** que promovam **déficit de memória e/ou morte de neurônios hipocampais**.