



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA
CELULAR
(ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS)

MARCOS VINÍCIUS LEBREGO NASCIMENTO

***Physalis angulata* ESTIMULA PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS-
TRONCO NEURAIS DO GIRO DENTEADO HIPOCAMPAL DE
CAMUNDONGOS ADULTOS**

BELÉM/PA

2013

MARCOS VINÍCIUS LEBREGO NASCIMENTO

***Physalis angulata* ESTIMULA PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO
NEURAIS DO GIRO DENTEADO HIPOCAMPAL DE CAMUNDONGOS
ADULTOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Área de concentração em Neurociências, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Gilmara de Nazareth Tavares Bastos. Laboratório de Neuroinflamação- ICB - UFPA

BELÉM/PARÁ

2013

MARCOS VINÍCIUS LEBREGO NASCIMENTO

***Physalis angulata* ESTIMULA PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO
NEURAIS DO GIRO DENTEADO HIPOCAMPAL DE CAMUNDONGOS
ADULTOS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Área de Concentração em Neurociências, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

Data da avaliação: 01 de Julho de 2013

Banca Examinadora:

Professora Doutora Gilmara Bastos (Orientadora)
Instituto de Ciências Biológicas- UFPA

Professor Doutor Milton Nascimento da Silva
Instituto de Ciências Exatas e Naturais- UFPA

Professora Doutora Barbarella de Matos Macchi
Instituto de Ciências Biológicas- UFPA

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais **Raimundo Nascimento** e **Cristina Lebrego** pela paciência, amor, carinho, confiança e principalmente pelo apoio a todas as decisões importantes da minha vida.

À minha orientadora, Professora Dr^a. **Gilmara Bastos** por sempre acreditar na minha capacidade em realizar trabalhos científicos e pelas críticas construtivas. E particularmente pelas palavras de incentivo durante todas as dificuldades.

Ao chefe do Laboratório de Neuroquímica Molecular e Celular, da Universidade Federal do Pará, Professor Dr. **José Luiz Martins do Nascimento**, pelo apoio fundamental ao desenvolvimento deste trabalho.

Ao Professor Dr. **Milton Nascimento da Silva**, do Laboratório de Cromatografia Líquida do Instituto de Ciências Exatas e Naturais, da Universidade Federal do Pará, pelo fornecimento do extrato e da substância purificada utilizados neste trabalho.

À Professora Dr^a. **Edilene Silva**, do Laboratório de Biologia Estrutural da UFPA, pela permissão ao uso dos equipamentos do Laboratório que foram de grande importância para concretização deste trabalho.

Ao Professor Dr. **Ricardo Augusto Melo de Reis**, do Laboratório de Neuroquímica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, pela permissão na realização de parte dos experimentos apresentados neste trabalho.

Aos professores **Luis Antônio Maués, Paulo Avila e Anderson Bentes** pelas importantes contribuições durante os experimentos.

À técnica do Laboratório de Neuroquímica **Neide Ramos** por todo o apoio durante as realizações dos experimentos.

A **UFPA** e a todos os professores e funcionários do Instituto de Ciências Biológicas e, a **CAPES, CNPq e FAPESPA** pelo incentivo à Pesquisa Científica e auxílio financeiro ao longo desses anos.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste estudo.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	11
1.1. O DOGMA DA NEUROCIÊNCIA E A NEUROGÊNESE NO MAMÍFERO ADULTO: PERSPECTIVA HISTÓRICA	11
1.2. REGIÕES NEUROGÊNICAS NO CÉREBRO DE MAMÍFEROS ADULTOS	13
1.2.1. Hipocampo	15
1.3. INCORPORAÇÃO DO BrdU: UMA CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA NEUROGÊNESE HIPOCAMPAL.....	21
1.4. FATORES QUE MODULAM A NEUROGÊNESE HIPOCAMPAL.....	24
1.5. BIODIVERSIDADE NA AMAZÔNIA A FONTE DE NOVOS FÁRMACOS. 26	
1.5.1. A ESPÉCIE VEGETAL <i>Physalis angulata</i>	27
1.5.1.1. Classificação Botânica	27
1.5.1.2. Descrição da planta.....	27
1.5.1.3. Atividades Biológicas.....	30
1.6. OBJETIVOS	32
1.6.1 OBJETIVO GERAL.....	32
1.6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
2. MATERIAL E MÉTODOS	33
2.1. PLANTA MEDICINAL: PREPARAÇÃO DO EXTRATO AQUOSO E DA SUBSTÂNCIA PURIFICADA.....	33
2.2. ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	33
2.3. ADMINISTRAÇÃO DA DROGA E DESENHO EXPERIMENTAL.....	33
2.4. IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA BrdU	34

2.5. QUANTIFICAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS BrdU POSITIVAS	34
2.6. IMUNOFLOURESCÊNCIA PARA CÉLULAS-TRONCO DIFERENCIADAS	34
2.7. CULTURA DE CÉLULAS-TRONCO NEURAIIS DO HIPOCAMPO	35
2.8. IMUNOCITOQUÍMICA PARA NESTINA	36
2.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
3. RESULTADOS	37
3.1. <i>Physalis angulata</i> ESTIMULA PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO NEURAIIS.	37
3.2. E.A AUMENTA O NÚMERO DE CÉLULAS BrdU POSITIVAS NA ZSG... ..	41
3.3. EA AUMENTA O NÚMERO DE CÉLULAS BrdU POSITIVAS DURANTE O PERÍODO DE DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO NEURAIIS.	42
3.4. EFEITO DO TRATAMENTO COM EA NA DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO NEURAIIS.	45
3.5. FISALINA D ESTIMULA PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO NEURAIIS.	48
4. DISCUSSÃO	53
5. CONCLUSÃO.....	59
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Células-tronco neurais.....	4
Figura 2. Neurogênese e célula-tronco neural no cérebro de mamífero adulto..	5
Figura 3. Neurogênese no hipocampo.....	7
Figura 4. Molécula de BrdU.....	12
Figura 5. Folhas e caule da <i>Physalis angulata</i>	17
Figura 6. Flor da <i>Physalis angulata</i>	18
Figura 7. Fruto da <i>Physalis angulata</i>	18
Figura 8. Figura 8 - Efeito proliferativo do EA da <i>Physalis angulata</i> sobre as células-tronco neurais do GD hipocampal de camundongos adultos da linhagem BALB/c.....	26
Tabela 1. Efeito do EA da <i>Physalis angulata</i> sobre o número de células BrdU positivas na zona subgranular.....	29
Figura 9. Regulação do número de células BrdU+ pelo EA da <i>Physalis angulata</i> no GD hipocampal.....	30
Figura 10. Efeito do EA da <i>Physalis angulata</i> sobre o número de células BrdU positivas no GD hipocampal de camundongos adultos da linhagem BALB/c.....	33
Figura 11. Imagens representativas da imunofluorescência para BrdU de animais sacrificados 7 dias após administração do BrdU.....	35
Figura 12. Imagens representativas da imunofluorescência para dupla marcação GFAP/BrdU.....	40
Figura 13. Imagens representativas da imunofluorescência para dupla marcação NeuN/BrdU.....	55
Figura 14. Efeito da substância purificada do EA da <i>Physalis angulata</i> , Fisalina D, sobre o número de células BrdU+ no GD hipocampal.....	56
Figura 15. Imagens representativas da imunofluorescência para nestina.....	57
Figura 16. Imagens representativas da imunofluorescência para nestina em cultura de CTNs.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxirribonucléico
BO: Bulbo Olfatório
BMP: Bone Morphogenetic Protein
BrdU: 5-bromo-2'-deoxiuridina
CA3: Corno de Amon 3
CGC: Camada Granular de Células
CTN: Célula-tronco neural
DCX: Doublecortina
EA: Extrato Aquoso
EDTA: Etilenodiaminotetracético
EGF: Epidermal Growth Factor
FGF: Fibroblast Growth Factor
FMR: Fluxo Migratório Rostral
GD: Giro Denteado
GFAP: Glial Fibrillary Acidic Protein
HCl: Ácido Clorídrico
IP: Intraperitonealmente
LPS: Lipopolysaccharide
MHM: Media-Hormone Mix
NaCl: Cloreto de Sódio
NeuN: Neuronal Nuclei
PFA: Paraformaldehyde
PBS: Phosphate-Buffered Saline
SNC: Sistema Nervoso Central
TBS: Tris-Buffered Saline
TNF- α : Tumor Necrosis Factor -alpha
ZSG: Zona Subgranular
ZSV: Zona Subventricular

RESUMO

A zona subgranular (ZSG) do giro denteado (GD) de mamíferos adultos é conhecida por produzir constantemente novos neurônios. A busca por novas moléculas que possam modular a formação de novas células neurais são bastante atuais. Visto que a Amazônia é conhecida mundialmente pela sua biodiversidade, com um potencial pouco explorado de fármacos naturais derivados de plantas medicinais típicas da região. O trabalho buscou investigar o efeito neurogênico do extrato aquoso (EA) da *Physalis angulata* e da substância purificada Fisalina D sobre as células-tronco do GD do hipocampo de camundongos adultos. Os camundongos machos (BALB/c), 6 a 8 semanas de idade foram divididos em quatro grupos experimentais: controle e tratados com EA ou substância purificada. Os animais receberam diferentes doses do extrato (0,1; 1 e 5 mg/Kg) e/ou substância purificada (5mg/Kg) ou salina (grupo controle), 5 horas depois uma única dose de 5-Bromodeoxiuridina (BrdU) [50mg/kg]. Em seguida, os animais foram sacrificados 24 horas ou 7 dias após a administração do BrdU. Os cérebros foram coletados e cortes coronais do hipocampo (40 μ m) foram realizados para contagem das células BrdU-positivas no GD hipocampal. Para avaliação estatística realizamos análise de variância (ANOVA) das médias amostrais seguida pelo pós-teste *t* de Student. O EA promoveu um aumento significativo do número de células BrdU positivas no GD dos grupos tratados em relação ao grupo controle [Controle, 92 \pm 24 (n=9); 0,1mg/Kg, 160 \pm 22 (n=4); 1mg/Kg, 310 \pm 5 (n=4); 5mg/Kg, 501 \pm 24 (n=3)] nos animais sacrificados 24 horas após administração do BrdU. Quando os animais foram sacrificados 7 dias após administração do BrdU, o número de células BrdU+ no GD também foi maior no grupo tratado em relação ao controle [Controle, 107 \pm 7 (n=4); 5mg/Kg, 145 \pm 23 (n=4)]. Usando a substância purificada, Fisalina D, também observamos um aumento do número de células BrdU+ no GD do grupo tratado com a droga em relação ao grupo controle [Controle, 92 \pm 24 (n=9); Fisalina D, 5mg/Kg, 316 \pm 37 (n=3)]. Este resultado sugere que o EA e a substância purificada, na dose de 5 mg/Kg, estimulam a proliferação de células BrdU-positivas na ZSG do GD do hipocampo de camundongos adultos

Palavras chaves: Neurogênese, hipocampo, proliferação, células-tronco.

ABSTRACT

Aim: Newborn neurons emerge from neural stem cells (NSCs) from niches in the mammalian adult brain. These cells are incorporated into functional circuits and may be important to acquisition and retention of memory. Therefore, the search for new compounds that enhance proliferation and differentiation of neural stem cells in the hippocampus represent a significant scientific challenge with great promise. **Methods and results:** We have used aqueous extract from of the *Physalis angulata* on the neurogenesis in the subgranular zone of hippocampal dentate gyrus of adult mice using 5`-bromo-2`-deoxyuridine (BrdU)-pulse chase method. Increased doses (0.1; 1; 5mg/Kg) of *Physalis angulata* were given to adult male BALB/c mice with 6 to 8-weeks-old; or 0.9% NaCl (control). Mice were sacrificed at 24 hours or 7 days after the BrdU administration, and hippocampal slices were processed for immunohistochemistry. We found that *Physalis angulata* did not modify the mice behavior at any dose used, but increased the number of BrdU-positive cells in the subgranule zone of hippocampal dentate gyrus 24 hours or 7 days after injection. *Physalis angulata* not showed BrdU-positive cells out subgranule cell layer (ectopic neurogenesis). All procedures involving animal care and experimentation were performed in accordance with the guidelines of the Ethical Committee for Research with Experimental Animals of the Universidade Federal do Pará (BIO058-12). **Conclusion:** These results suggest that SM2 could be stimulating the proliferation of neural stem cells in hippocampal dentate gyrus, and also sustain the hippocampal network because increases the BrdU-positive cells in differentiation process in the sub granular zone of hippocampus of adult mice.

Key words: neurogenesis, hippocampus, proliferation, stem cells.

1. INTRODUÇÃO

1.1. O DOGMA DA NEUROCIÊNCIA E A NEUROGÊNESE NO MAMÍFERO ADULTO: RETROSPECTIVA HISTÓRICA

O sistema nervoso central (SNC) é uma estrutura precisa e complexa que permite aos animais realizarem diversas funções. Em mamíferos adultos, o sistema nervoso forma-se a partir de uma série de eventos complexos e coordenados que ocorrem durante o desenvolvimento embrionário e pós-natal. A curiosidade e os questionamentos do homem em relação ao funcionamento e organização desse sistema foram sendo revelados ao longo da história da neurociência (Llinás, 2003).

Desta forma, diversos pesquisadores contribuíram de forma significativa para desvendar a citoarquitetura do SNC de mamíferos adultos. Os primeiros trabalhos surgiram ao final do século XIX. No ano de 1896, Koelliker e colaboradores *apud* Gross (2000) descreveram em detalhes o desenvolvimento do SNC de humanos e de outros mamíferos. Eles concluíram que a estrutura do cérebro se mantinha fixa e imutável logo após o nascimento, com isso a ideia de novos neurônios formados no SNC de mamíferos adultos era inconcebível nesse momento (Gross, 2000).

Nesta mesma linha de raciocínio, o histologista e fisiologista espanhol Santiago Ramón y Cajal, utilizando uma técnica histológica com nitrato de prata para marcar diferentes tipos de células nervosas, descreveu detalhadamente o desenvolvimento de vários tipos de neurônios e as estruturas celulares no SNC de mamíferos adultos. Indubitavelmente, os trabalhos publicados por Cajal foram de extrema importância, por isso Cajal recebeu o prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina, em 1906, como reconhecimento ao seu trabalho (Sotelo, 2003 e De Castro, 2007).

Apesar da imprescindível contribuição de Cajal para o entendimento da organização e constituição do sistema nervoso, nenhuma estrutura mitótica, durante os diferentes estágios do desenvolvimento, foi descrita no SNC de mamíferos adultos. Devido à arquitetura do cérebro aparentemente se manter

constante, a suposição de que novos neurônios não podiam ser adicionados à rede neural do indivíduo adulto, perdurou por 100 anos, e o nascimento de novos neurônios no cérebro de mamíferos adultos era considerada uma ilusão (Gross, 2000).

Essa ideia começa a ser criticada, somente na primeira metade do século XX, quando foram publicados os primeiros estudos sobre a formação de novos neurônios no cérebro pós-natal em mamíferos. Por exemplo, Schaper *apud* Gross (2000) observou a existência de células “indiferenciadas” amplamente distribuídas no cérebro de teleósteos e em humanos adultos e que essas células indiferenciadas poderiam originar neurônios ou células gliais (Gross, 2000).

Na mesma época, em 1901, Hamilton *apud* Gross (2000) observou mitoses em ratos com quatro anos de idade. Onze anos depois, Allen *apud* Gross (2000) observou figuras mitóticas no cérebro de ratos com até 120 dias após o nascimento destes. Em 1959, Bryans e colaboradores utilizando colchicina, um inibidor de mitose celular, detectaram divisão celular no cérebro dos ratos que apresentavam no mínimo um ano de idade (Gross, 2000).

Apesar de muitos trabalhos mostrarem algumas evidências da formação de novos neurônios no cérebro de mamíferos mais estudos foram necessários. Portanto, na década de 60, Joseph Altman publicou uma série de trabalhos na qual utilizando como técnica principal de investigação a autoradiografia com timidina tritiada [H^3], publicou o primeiro trabalho em 1962, na revista *Science*, tendo como título uma pergunta: “*Novos neurônios são formados no cérebro de mamíferos adultos?*”. Os resultados do trabalho mostraram novos neurônios formados no cérebro de ratos adultos que sofreram lesão cerebral, sugerindo um processo de neurogênese no cérebro desses animais (Altman, 1962).

Ainda utilizando a técnica de autoradiografia em ratos jovens (três meses de idade) tratados com timidina tritiada, Altman e Das revelaram evidências de formação de novos neurônios no giro denteado do hipocampo desses animais (Altman & Das, 1965). Altman também descreveu a

neurogênese em várias áreas do cérebro de ratos neonatos (Altman & Das, 1966) e no bulbo olfatório de ratos adultos (Altman, 1969).

Todos esses trabalhos foram publicados nas revistas mais prestigiadas dentro da comunidade científica, no entanto os resultados foram ignorados e considerados sem importância por mais de duas décadas (Gross, 2000). Apesar de esses estudos mostrarem a existência de células em divisão no cérebro de mamíferos adultos, para romper com a ideia central da neurociência, de que o SNC é fixo e imutável, havia a necessidade de mais evidências com o desenvolvimento de novas metodologias para estudo da neurogênese em mamíferos adultos (Gross, 2000).

Atualmente, a neurogênese é universalmente aceita na comunidade científica e este fenômeno é também observado no desenvolvimento pré-natal e pós-natal de mamíferos, o que permitiu aos poucos a “morte” do dogma central da neurociência (Gross, 2000).

1.2. REGIÕES NEUROGÊNICAS NO CÉREBRO DE MAMÍFEROS ADULTOS

No SNC de mamíferos adultos existem células, denominadas células-tronco neurais (CTNs), que apresentam como principais características, alta capacidade de proliferação, auto renovação e multipotencialidade, ou seja, podem diferenciar nos principais fenótipos celulares do SNC, como neurônios, astrócitos e oligodendrócitos (Temple & Alvarez-Buylla, 1999; Gage, 2000) (Fig.1).

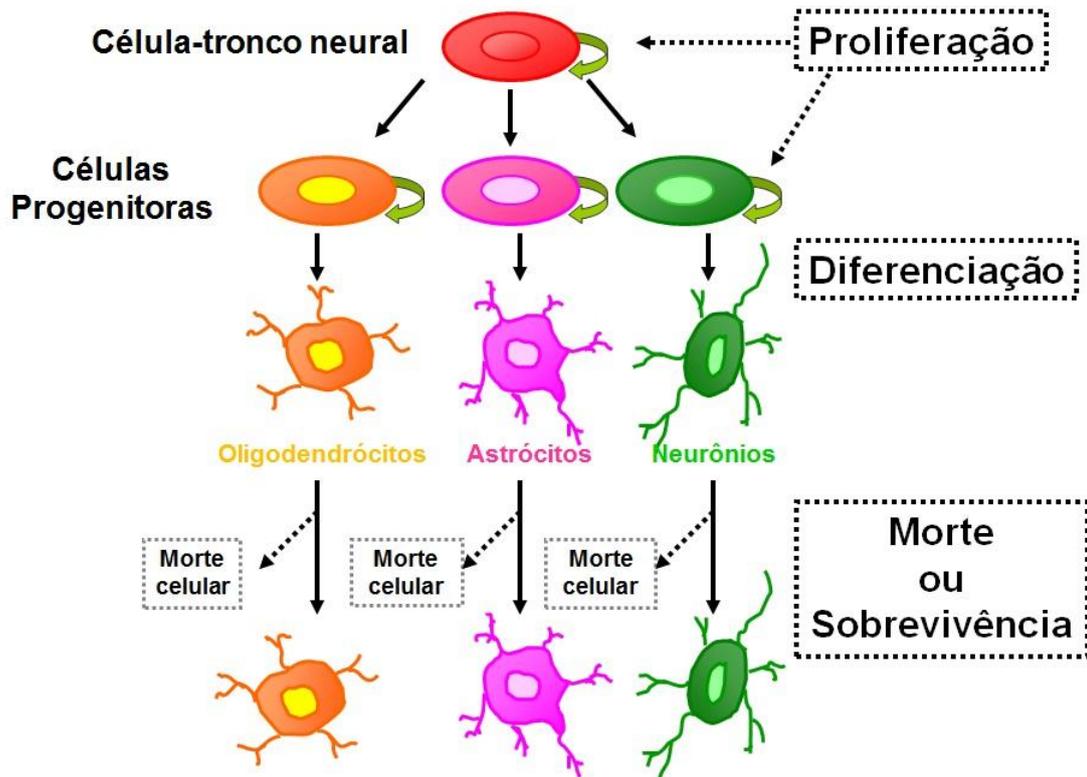


Figura 1 – Células-tronco neurais. A célula-tronco neural (vermelho) origina células progenitoras. As células progenitoras podem diferenciar em oligodendrócitos (laranja), astrócitos (rosa) e neurônios (verde). As células do sistema nervoso central podem sobreviver integrando o sistema neuronal ou sofrendo morte celular por apoptose. (Modificado de Taupin, 2006).

As CTNs podem ser isoladas de muitas áreas do sistema nervoso de organismos adultos, mas no SNC de mamíferos adultos, as CTNs estão localizadas na zona subventricular (ZSV) do bulbo olfatório (BO) (Lois & Alvarez-Buylla, 1993) e na zona subgranular (ZSG) do giro dentado (GD) hipocampal (Eriksson et al., 1998; Cameron & McKay, 2001 e Gage et al., 2002) (Fig. 2). É suposto que o microambiente da ZSG e ZSV, conhecido como nicho neurogênico, pode apresentar diversos fatores que permitem a diferenciação e integração destes novos neurônios (Zhao et al., 2008).

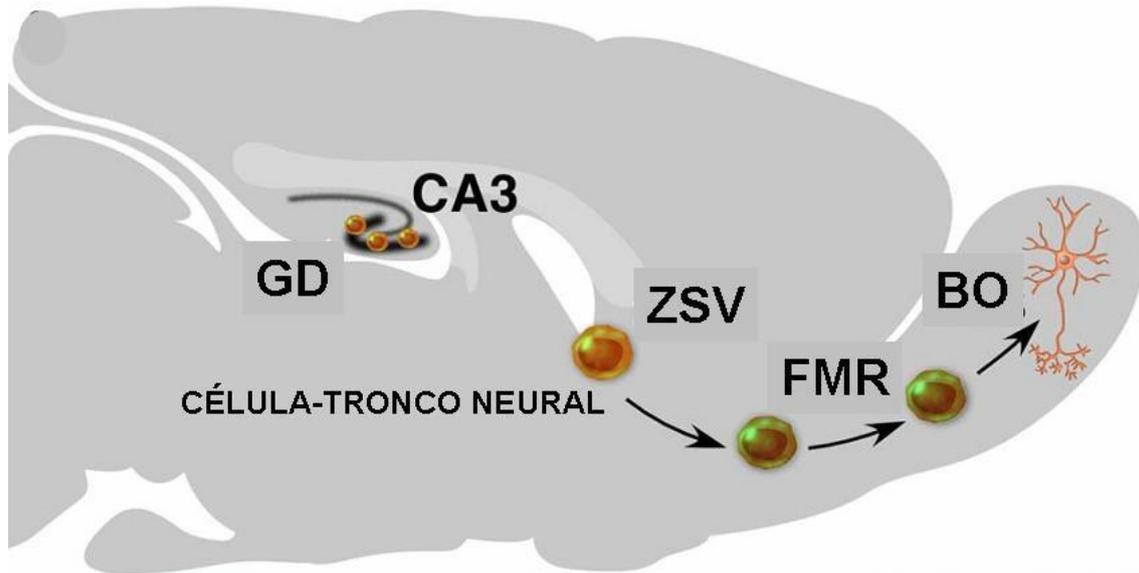


Figura 2- Neurogênese e célula-tronco neural no cérebro de mamífero adulto. A célula-tronco neural é encontrada no giro denteado (GD) hipocampal e na zona subventricular (ZSV). No GD, os novos neurônios são formados na zona subgranular e estabelecem conexão com neurônios de outra região do hipocampo (CA3). Na ZSV, os neurônios formados migram para o bulbo olfatório (BO), através do fluxo migratório rostral (FMR) e integram o circuito neuronal/ (Modificado de Taupin, 2006).

1.2.1. Hipocampo

O termo hipocampo foi utilizado pela primeira vez, durante o século XVI, pelo anatomista italiano Giulio Cesare Aranzi (1587), que considerou a forma tridimensional do hipocampo humano semelhante ao cavalo marinho (*Hippocampus Ieria*)/ (Amaral & Lavenex, 2007).

O hipocampo propriamente dito compreende uma das regiões da chamada formação hipocampal (giro denteado, subiculum, presubiculum, parasubiculum e córtex entorrinal), sendo que o hipocampo apresenta três subdivisões: CA3, CA2 e CA1 (CA vem do latim “cornus ammonis” e significa Corno de Amon, referente à forma do hipocampo semelhante ao chifre de uma das representações do Deus egípcio Amon Knep)/ (Amaral & Lavenex, 2007).

O GD é uma região hipocampal cortical trilaminar que apresenta uma característica peculiar quanto à forma em V ou U. As principais células que constituem o GD são as células granulares, que recebem projeções do córtex entorrinal através da via perfurante (Amaral & Lavenex, 2007).

As células granulares comunicam-se com neurônios piramidais de CA3, emitindo projeções axonais denominadas de fibras musgosas. Os neurônios piramidais de CA3 lançam seus axônios para formar sinapses com as células piramidais de CA1 via denominada de colateral de Schaffer (Amaral & Lavenex, 2007).

A comunicação neural que ocorre no hipocampo, conhecida como circuitaria trisináptica (GD → CA3 → CA1), é uma organização crucial para a formação de certos tipos de memórias, tais como memória episódica e espacial (Squire, 1992).

Na ZSG do GD, definida como uma região com uma espessura de dois corpos celulares (aproximadamente 10 µm) ao longo da borda do hilo e da camada granular de células (CGC) (Katura et al., 2010), encontram-se as CTNs que devido as suas propriedades de auto-renovação e multipotência, podem originar neurônios, astrócitos (Cameron et al., 1993; Gage, 2000 e Reynolds & Weiss, 1992) e oligodendrócitos (Palmer et al., 1997), tanto *in vivo* como *in vitro*.

O processo de neurogênese que ocorre no GD do hipocampo inicia com a proliferação das 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 (Fig.3)/ (Altman, 1969; Cameron et al., 1993; Cameron & McKay, 2001).

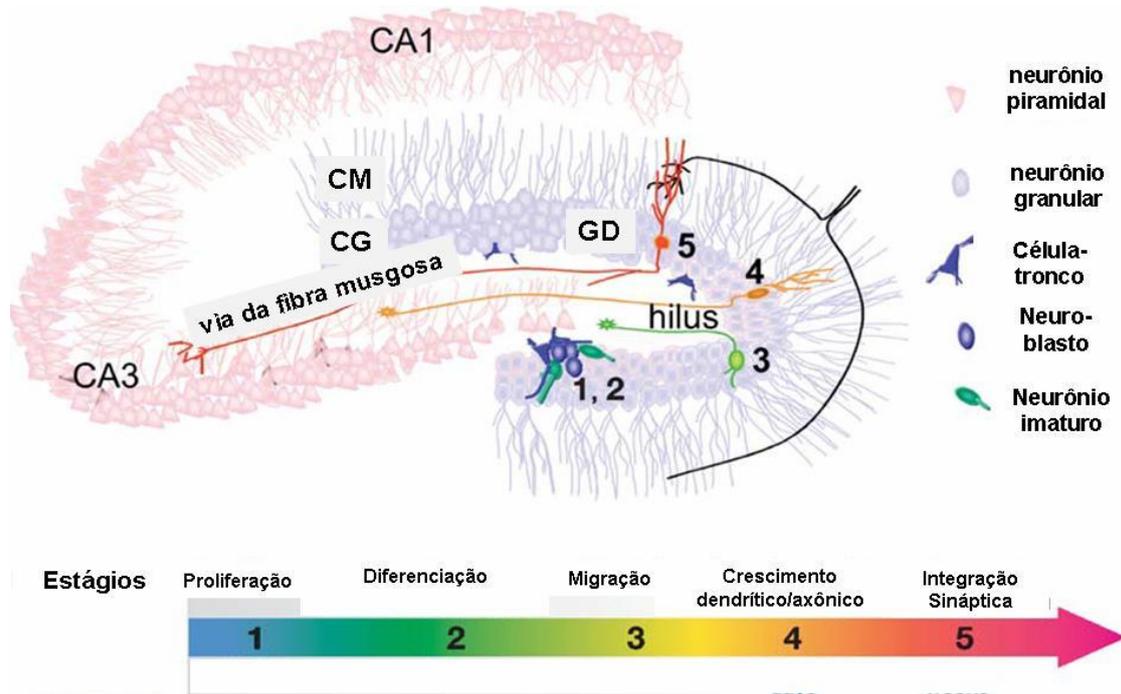


Figura 3- Neurogênese no hipocampo. A geração de novos neurônios no hipocampo de mamíferos adultos ocorre no giro denteado (GD) devido células-tronco neurais (CTNs), localizadas especificamente na zona subgranular do GD, que apresentam a propriedade de multipotência. A neurogênese no GD hipocampal é um processo altamente complexo sendo dividido em cinco etapas distintas: Estágio 1. Proliferação das CTNs na zona subgranular do giro denteado. Estágio 2. Diferenciação das CTNs em neurônios imaturos. Estágio 3. Migração de uma curta distância dos neurônios imaturos da zona subgranular para a camada granular de células (CG). Estágio 4. Crescimento dendrítico e axônico dos neurônios granulares da CG. Os neurônios granulares estendem suas projeções axonais ao longo da via das fibras musgosas para neurônios piramidais de CA3. Estágio 5. Integração sináptica dos novos neurônios granulares que recebem inputs do córtex entorrinal e enviam outputs para CA3 (Modificado de Ming & Song, 2005).

No GD de ratos adultos, as células neuronais recém-formadas migram uma curta distância para a camada granular de células originando neurônios granulares, onde diferenciam em células neuronais granulares e estendem suas projeções axonais através das fibras musgosas para a região de CA3 do hipocampo em um período de 4-10 dias (Hastings & Gould, 1999).

A diferenciação de CTNs no GD de ratos adultos produz uma quantidade significativa de novas células entre neurônios e glias, sendo a maioria neurônios, enquanto que o processo de maturação dessas células formadas, da proliferação na ZSG, migração para a camada granular e diferenciação em células granulares neuronais, leva aproximadamente quatro semanas (Cameron et al., 1993).

Em ratos adultos a taxa de células em proliferação é de 9.400 células, com um ciclo celular durando 25 horas, aproximadamente nove mil novos neurônios são gerados por dia no GD desses animais, contribuindo em termos de 250.000 ao mês na população de células granulares do GD (Cameron & Mckay, 2001).

Entretanto, em macacos adultos, estima-se que pelo menos 0,004% do total da população neuronal na camada de células granulares são novos neurônios gerados por dia, isto representa um novo neurônio gerado por dia a cada 24.000 neurônios existentes na camada granular de células (Kornack & Rakic, 1999). Comparando a taxa relativa de neurogênese em macacos adultos é cerca de 10 vezes menor do que no GD de roedores adultos (Kornack & Rakic, 1999).

Em humanos, a formação de novos neurônios foi demonstrada pela primeira vez por Eriksson e colaboradores (1998), revelando a neurogênese em regiões previamente descritas como neurogênicas, em ratos e macacos adultos. As amostras de tecido cerebral *post-mortem* obtidas de pacientes com câncer que receberam uma única dose de 250 mg/Kg de BrdU via injeção intravenosa foram identificadas células BrdU positivas no hipocampo e a geração de novos neurônios nesta região em humanos adultos (Eriksson et al., 1998).

Ainda em uma análise quantitativa por estereologia, camundongos com 21 dias de idade, mantidos em um ambiente enriquecido têm maior número de células granulares no GD, aproximadamente 310.000, em comparação com animais controles mantidos em gaiolas normais que apresentavam apenas 270.000 células granulares, portanto representa 40.000 mil neurônios a mais, em termo de porcentagem corresponde aproximadamente 15% (Kempermann et al., 1997).

O fenômeno da neurogênese no GD hipocampal ocorre em um microambiente funcional, definido como nicho neurogênico, podendo ser regulado por diversos fatores. Os componentes funcionais e anatômicos do nicho neurogênico ainda não estão devidamente determinados, mas sabe-se que vários tipos celulares compõem esse ambiente, incluindo os astrócitos, células endoteliais, células ependimárias, neurônios maduros locais, e os progenitores imaturos derivados de CTNs adultas (Ming & Song, 2005; Zhao et al., 2008).

As moléculas de sinalização extracelulares presentes no microambiente da ZSG possuem habilidade de promover a neurogênese, modulando a atividade das CTNs, no entanto pouco se sabe sobre as vias de sinalização que regulam a neurogênese hipocampal adulta (Zhao et al., 2008).

Em 2002, Song e colaboradores investigaram a participação dos astrócitos hipocampais de ratos adultos sobre a neurogênese no GD, observaram que os astrócitos do hipocampo desempenham um papel fundamental na diferenciação das CTNs adultas, mostrando que na presença desses astrócitos as CTNs adultas originam maior número de células MAP2ab positivas (marcador específico para neurônio maduro), também foi possível observar uma proximidade entre as duas células indicando uma possível influencia entre essas células (Song et al., 2002).

Os astrócitos hipocampais modulam a neurogênese através de uma via de sinalização da proteína Wnt regulando proliferação e diferenciação das CTNs no hipocampo de ratos adultos. Estudos recentes mostraram que os astrócitos expressam diferentes membros da família Wnt e que devido à

síntese dessas proteínas ocorre diferenciação de CTNs adultas. Estas proteínas atuam nas CTNs, que expressam o receptor transmembranar, bem como os componentes da via de sinalização da Wnt, por exemplo, ao inibir a via de sinalização da Wnt o número de células MAP2ab positivas e DCX positivas (marcador específico de neurônio imaturo) diminuíram significativamente em relação ao controle (Lie et al., 2005). A sinalização autócrina de Wnt promove proliferação e multipotência das CTNs através da via canônica envolvendo GSK3 β / β -catenina (Wexler et al., 2009).

A via de sinalização da Wnt/ β -catenina aumenta a expressão do fator de transcrição NeuroD1, este é conhecido por promover a diferenciação neuronal de células-tronco neurais. Além disso, em resposta a Wnt, as CTNs aumentam a expressão de LINE-1, um retrotransposon importante na sobrevivência de CTNs (Kuwabara et al., 2009), sugerindo que as vias de sinalização do Wnt participam de todas as etapas da neurogênese adulta.

Na ZSG, os tipos celulares que compõem o microambiente têm sido identificados baseados em suas características morfológicas, comportamento proliferativo e expressão de marcadores (Alvarez-Buylla & Lim, 2004 e Seri et al., 2004).

Desta forma, uma população de células identificadas como células radiais (denominadas células tipo 1) atuam como CTNs quiescentes, que expressam Sox2 (fator de transcrição envolvido na proliferação de CTNs), nestina (proteína de filamento intermediário expresso em CTNs) e GFAP (Proteína Glial Fibrilar Ácida) podem gerar ativamente por auto-renovação progenitores neurais não radiais (denominadas células tipo 2)/ (Suh et al., 2007).

As células tipo 2 não expressam GFAP, mas expressam Sox2 e nestina, embora expressem o marcador para astrócitos, as células tipo 2 são morfológica e funcionalmente diferentes de astrócitos maduros. As células tipo 2, por sua vez dão origem a neuroblastos DCX+ (doublecortina-marcador de neurônio imaturo) que diferenciam em células granulares

denteadas glutamatérgicas, podem também originar astrócitos (Suh et al., 2007).

Estas células vizinhas exercem influências sobre os progenitores neurais devido às interações célula-célula. Por outro lado, progenitores neurais podem ser indiretamente influenciados por neurônios fora do seu microambiente que são conectados através de circuitarias neurais, sugerindo uma complexa regulação intrínseca.

1.3. INCORPORAÇÃO DO BrdU: UMA CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA NEUROGÊNESE HIPOCAMPAL

No final da década de 1950, um importante avanço no estudo da neurogênese ocorreu com a introdução da autoradiografia da timidina tritiada [H^3], que se incorpora ao ácido desoxirribonucléico (ADN) das células em divisão, sendo este novo método inicialmente utilizado para estudo do desenvolvimento de roedores (Sidman et al., 1959).

Sendo assim, em 1961, Smart utilizou pela primeira vez a técnica da autoradiografia para estudo da proliferação celular no cérebro de camundongo adulto (Smart et al., 1961).

O uso de um substrato marcado radioativamente e o tempo consumido durante o processo envolvendo a técnica da autoradiografia com timidina [H^3], necessitou do desenvolvimento de novas estratégias para estudo da neurogênese pré e pós-natal em mamíferos (Taupin, 2007).

Somente em 1988, Miller e Nowakowski introduziram o uso de um análogo sintético da timidina para estudar a proliferação, migração e a origem das células no SNC de camundongos e ratos, denominado 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) (Miller e Nowakowski, 1988).

O BrdU (Fig.4) é um marcador da proliferação celular, que incorpora-se ao ADN das células, durante a fase S do ciclo celular, permitindo a identificação dessas células pela técnica da imunohistoquímica desenvolvida em 1982, na qual um anticorpo específico liga-se ao BrdU, podendo detectar células em

proliferação (Gratzner, 1982). Esta descoberta proporcionou o desenvolvimento de uma técnica importante para o estudo da proliferação celular e da neurogênese no cérebro de mamíferos adultos (Gross, 2000).

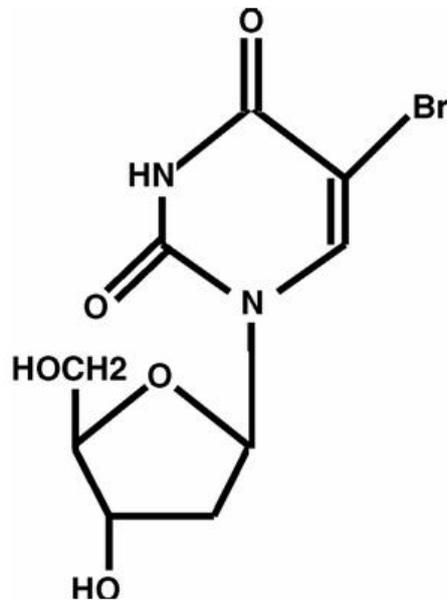


Figura 4 – Molécula de BrdU (5-bromo-2'-deoxiuridina) um análogo sintético da base nitrogenada timidina que incorpora-se ao ADN das células durante a fase S do ciclo celular.

Esse método apresenta vantagens em relação à autoradiografia da timidina tritiada [H^3], possibilitando um estudo mais rápido e sem uso de material radioativo. Ao investigar a neurogênese no hipocampo de mamíferos adultos, a incorporação do BrdU ao ADN das células em proliferação, depende diretamente das vias de administração e das doses utilizadas durante o estudo (Taupin, 2007).

Estudos, *in vivo*, utilizam diferentes vias de administração do marcador de proliferação celular, por exemplo, injeção intracerebroventricular, na qual disponibiliza uma alta concentração de BrdU no cérebro (Zhao et al., 2003) e injeções intraperitoneal ou intravenosa que são mais comumente usadas para o estudo da neurogênese hipocampal, visto que torna-se dispensável a

realização de cirurgias no modelo de estudo (Kuhn et al., 1996; Kornack & Rakic, 1999 e Gould et al., 2001).

O efeito e a capacidade do BrdU de se incorporar ao ADN das células em proliferação, também depende da dose utilizada para investigar a neurogênese hipocampal, por exemplo doses de 50 mg/Kg (Kornack & Rakic, 1999; Burns & Kuan, 2005; Kempermann et al., 1997; Palmer et al., 2000; Kuan et al., 2004; Kronenberg et al., 2003 e Bastos et al, 2008c) ou 100 mg/Kg permitiram uma quantificação significativa do número de células em proliferação (Zhao et al., 2003; Lie et. al., 2002 e Cameron & Mckay, 2001).

Esse marcador exógeno, também pode ser utilizado *in vitro*, com isso viabilizando a continuidade de análises e estudos de mecanismos de proliferação, diferenciação e sobrevivência em diversos modelos experimentais utilizando indivíduos adultos ou embrionários (Katura et al., 2010 e Qu et al, 2010).

Mandyam e colaboradores (2007) realizaram um trabalho completo sobre a cinética farmacológica do marcador exógeno, BrdU, na qual a biodisponibilidade do BrdU na ZSG do hipocampo de camundongos machos adultos, em uma administração intraperitoneal, ocorre em um período de 0,25 horas (15 minutos) após administração sistêmica (Mandyam et al., 2007).

A técnica de marcação com BrdU possibilitou o estudo da proliferação das células-tronco, na ZSG do GD hipocampal de camundongos e ratos adultos, que apresentam comprimentos do ciclo celulares bem diferentes, em camundongos a duração do ciclo celular é de 12-14 horas, com a fase S é 6-7,6 horas, representando um percentual de 54-63%, essas informações são fundamentais para o estudo da neurogênese no hipocampo de camundongos (Hayes & Nowakowski, 2002, Burns & Kuan, 2005 e Mandyam et al, 2007).

Enquanto que em ratos adultos, a duração do ciclo celular das CTNs é de 24,7 horas, sendo que a fase S dura aproximadamente 9,5 horas, representando uma percentagem de 38% (Burns & Kuan, 2005). Portanto, para estudar o período de proliferação das CTNs na ZSG de camundongos adultos

o sacrifício dos animais 24 horas após o administração do BrdU é fundamental (Bastos et al., 2008c).

1.4. FATORES QUE MODULAM A NEUROGÊNESE HIPOCAMPAL

A formação de novos neurônios no GD hipocampal, pode ser regulada por fatores intrínsecos e extrínsecos, que influenciam de forma positiva ou negativa as diferentes etapas da neurogênese, incluindo proliferação, diferenciação, migração, sobrevivência e integração sináptica (Ming & Song, 2005).

A neurogênese, em mamíferos adultos, pode ser regulada por diversos fatores fisiológicos e patológicos (Taupin, 2006). Portanto, a aprendizagem dependente do hipocampo, em ratos adultos, aumenta o número células BrdU positivas, sendo que todas estas células formaram novos neurônios granulares na camada granular no GD desses animais após aprendizagem espacial (Gould et al. 1999).

O ambiente físico enriquecido também é um fator que estimula a neurogênese hipocampal em camundongos adultos, animais criados em gaiolas com estímulos ambientais (ninhos, túneis, brinquedos e rodas) encontramos aumento de células BrdU positivas e maior número de células granulares no GD hipocampal desses animais, quando comparado aos animais criados em gaiolas padronizadas (Kempermann et al., 1997).

A formação de novos neurônios no hipocampo de ratos adultos é regulada negativamente pela idade, ou seja, animais idosos (12 a 27 meses de idade) têm uma dramática redução da neurogênese e um declínio na atividade mitótica dos precursores neurais na SZG e na camada granular de células (Kuhn et al. 1996).

Alterações patológicas como, por exemplo, a epilepsia, a neurogênese é regulada positivamente. Como mostrou Parent et al. (1997), ao utilizar um modelo quimioconvulsivante estimulado por pilocarpina, desenvolveu a epilepsia do lobo temporal em ratos adultos e observou um aumento da

proliferação de precursores neurais na ZSG no hipocampo desses animais, sendo que a maioria dessas células originaram novos neurônios (Parent et. al., 1997).

A epilepsia causa também a morfogênese anormal de neurônios recém-formados como, o aparecimento de dendritos basais localizados no hilo do GD e migração de neurônios para o hilo, fenômeno denominado de neurogênese ectópica. A epilepsia leva também ao brotamento de fibras musgosas (Jessberger et al., 2007).

Doenças neurodegenerativas, como o Alzheimer que é caracterizada por um processo de demência generalizada e o aparecimento de marcadores histopatológicos, observa-se um declínio na proliferação e na formação de novos neurônios no GD em modelos animais de mal de Alzheimer (Rodríguez et al., 2008).

No caso de pacientes com doença de Parkinson, o número de progenitores em proliferação na ZSV e ZSG é maior nos cérebros *post-mortem* de indivíduos com doença de Parkinson, sugerindo que a geração de precursores neurais ocorre como consequência de degeneração de neurônios dopaminérgicos (Hoglinger et al., 2004).

Em modelos animais de neuroinflamação, provocados pela administração periférica da endotoxina bacteriana lipopolissacarídeo (LPS), ocorre intensa ativação de células microgliais. As microgliais liberam inúmeras citocinas pró-inflamatórias, que provocam alterações da neurogênese no GD hipocampal, diminuindo este processo em camundongos adultos (Monje et al., 2003) e causando morte de células-tronco neurais também no GD do hipocampo no cérebro de mamíferos adultos (Bastos et al., 2008c).

Em 1992, Gould e colaboradores, mostraram pela primeira vez que a divisão celular no GD hipocampal de ratos adultos é suprimida devido ao aumento no nível de corticosteróides, sendo este frequentemente elevado em animais que sofreram estresse (Gould et al., 1992). 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 (Sheline et al., 1996).

Em contraste, trabalhos mostram que administração crônica de medicamentos antidepressivos como, por exemplo, a fluoxetina (inibidor da recaptação de serotonina) em uma dose de 10mg/Kg, aumentou a neurogênese no hipocampo de camundongos adultos (Encinas et al., 2006) e promoveu um aumento do número de células BrdU positivas no GD hipocampal de ratos adultos (Malberg et al., 2000).

A compreensão do papel funcional da neurogênese provavelmente não está apenas relacionada ao conhecimento fundamental do sistema olfatório ou hipocampal, mas pode ajudar-nos ao desenvolvimento de novos tratamentos as doenças neurológicas humanas.

1.5. BIODIVERSIDADE NA AMAZÔNIA: FONTE DE NOVOS FÁRMACOS

A Amazônia representa uma das maiores riquezas existente no mundo, em termo de diversidade vegetal e animal, encontradas em sua floresta tropical. As espécies vegetais apresentam um enorme potencial do ponto de vista médico, entre elas as plantas medicinais que possuem atividades biológicas, com um ou mais princípios ativos (Ferreira, 1998).

A utilização da maioria das plantas medicinais no tratamento ou alívio de muitas doenças não possui qualquer comprovação científica, sendo apenas baseado em observações populares. Portanto, a biodiversidade e a etnofarmacologia servem de instrumentos para a busca de novos fármacos com possível potencial biológico (Ferreira, 1998).

Entre as várias plantas medicinais, a *Physalis angulata*, conhecida popularmente como camapú, possui em seu extrato diversos princípios ativos, apresentando efeitos importantes em modelos experimentais de inflamação (Bastos et al., 2008b) e analgesia (Bastos et al., 2006a).

1.51. A ESPÉCIE VEGETAL *Physalis angulata*

1.5.1.1. Classificação Botânica

A *Physalis angulata* pertence ao reino Plantae, divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, ordem Solanales e família Solanaceae. A família Solanaceae A. L. Jussie apresenta 92 gêneros, existindo aproximadamente 2300 espécies (Hunziker, 2001).

Dentre os 92 gêneros, podemos destacar alguns de importância econômica e farmacológica para o homem, entre eles a *Capsicum* (pimenta), a *Solanum* (tomate) e a *Physalis* (camapú). O gênero *Physalis* possui cerca de 90 espécies, entre as quais podemos destacar devido a importância econômica, *P. alkekengi*, *P. alkekengi var francheti*, *P. angulata*, *P. ixocarpa*, *P. lanifolia*, *P. mínima*, *P. peruviana*, *P. phyladelphia*, *P. pubescens*, *P. viscosa* (Hunziker et al., 2001).

1.5.1.2. Descrição da planta

A *P. angulata* apresenta hábito herbáceo e arbustivo, podendo medir de 30-50 cm de altura. As folhas alternas, pubescentes, tricomas simples glandulares e eglandulares; pecíolo canaliculado, 2-4 cm; lâmina oblonga a oval-lanceolada, ápice agudo ou acuminado, base aguda ou oblíqua, margem inteira ou levemente lobada. O caule ereto e formato triangular na base e na parte superior quadrangular, apresentando coloração verde claro (Fig.4). As flores são pequenas, com cálice rotáceo-campanulado e cinco sépalas; a corola também rotáceo-campanulado, coloração amarelo-pálida (Fig.5) e o fruto é comestível do tipo baga, com diâmetro de 1 a 1,5 cm, cor amarelo-esverdeado quando maduro, sendo totalmente envolvido pelo cálice acrescente e inflado (Fig.6) e com grande quantidade de semente (Silva & Agra, 2005).



Figura 5- Folhas e caule da *Physalis angulata*. As folhas verdes com ápice acuminado e base oblíqua. O caule formato triangular e coloração verde.



Figura 6- Flor da *Physalis angulata*. As flores são pequenas e coloração amarelo.



Figura 7- Fruto da *Physalis angulata*. O fruto do tipo baga, coloração amarelo-esverdeado e totalmente envolvido pelo cálice.

1.5.1.3. Atividades Biológicas

Na medicina popular os extratos ou infusos da *P. angulata* têm sido utilizados em vários países para o tratamento de diversas doenças, como malária, asma, hepatite, dermatite e reumatismo (Lin et al., 1992). É conhecido também o uso para o tratamento de gonorréia (Cáceres et al., 1995).

Choi e Hwang (2003) demonstraram o efeito antiinflamatório do extrato metálico, produzido a partir das flores da *Physalis angulata*, utilizando uma dose de 200 mg/Kg do extrato via administração oral, em modelos de inflamação como edema de pata induzido por carragenina, artrite induzida por formaldeído, além da atividade antialérgica contra reação de hipersensibilidade tipo IV induzida por contato com 2,4 dinitrofluorobenzeno (DNFB) (Choi e Hwang, 2003).

Bastos e colaboradores, em 2006, mostraram que diferentes doses (10, 20, 30, 60 mg/Kg) do extrato aquoso derivado das raízes da *Physalis angulata* possui um efeito antinocepcivo, quando administrado via intraperitoneal ou via oral, diminuindo significativamente o número de contorções abdominais induzida por ácido acético. Assim como, a dor induzida pela injeção intraplantar de formalina e também no teste da placa quente em camundongos (Bastos et al., 2006a).

Bastos et al. (2008b), também observaram o efeito antiinflamatório do extrato aquoso, em diferentes doses (0,5, 1 e 5 mg/Kg), derivado da raiz da *Physalis angulata* em ratos adultos com via de administração intraperitoneal, o extrato diminuiu o volume de exsudato e o número total de células em modelo de inflamação de bolsa de ar (Bastos et al., 2008b).

A atividade imunoduladora foi demonstrada por Soares et al., (2003) que mostraram o efeito das fisalinas B, F e G, seco-esteróides isolados do extrato etanólico da *Physalis angulata*, sobre a redução na produção de óxido nítrico em cultura de macrófagos ativados com LPS e interferon- γ . A fisalina B também reduziu significativamente os níveis de TNF- α , interleucina-6 e interleucina-12 (Soares et al., 2003).

Ribeiro et al., em 2002, investigaram o efeito antineoplásico do extrato etanólico da *Physalis angulata*, derivado do caule e da cápsula dos frutos, os

resultados obtidos mostraram uma significativa inibição de células de linfoma de camundongos e carcinoma de Erlich (Ribeiro et al., 2002).

Diante do conhecimento do amplo espectro de atividades biológicas do camapú, principalmente pelo efeito anti-inflamatório e sabendo também que em processos inflamatórios ocorre mudança no nicho neurogênico (Monje et al., 2003) e ainda diante do desafio de novas terapias para o tratamento de doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e doença de Parkinson (Lindavall et. al., 2006).

A descoberta de novos fármacos provenientes da biodiversidade amazônica, com possível efeito sobre a proliferação e/ou diferenciação dessas células pode oferecer um potencial significativo para o tratamento dessas doenças.

As pesquisas com CTNs aparecem como potencial terapia para tratamento das doenças que acometem o sistema nervoso, no entanto, mais estudos são necessários para compreender os mecanismos que regulam o comportamento das CTNs durante essas patologias (Lindavall e Kokaia, 2010).

1.6. OBJETIVOS

1.6.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os possíveis efeitos neurogênicos do extrato aquoso (EA) da *Physalis angulata* e da substância purificada do extrato, Fisalina D, sobre as células-tronco neurais do giro denteado hipocampal de camundongos adultos.

1.6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a dose resposta (0,1; 1 e 5mg/Kg) do extrato sobre o número e localização de células BrdU positivas no giro denteado hipocampal em animais sacrificados 24 horas após administração do BrdU;
- Analisar o efeito do extrato (5mg/Kg) sobre o número de células BrdU positivas no giro denteado hipocampal em animais sacrificados 7 dias após administração de BrdU;
- Analisar que populações celulares (neurônios ou astrócitos) são formadas no processo de diferenciação das células-tronco, no giro denteado hipocampal de camundongos tratados com EA da *Physalis angulata* (5 mg/Kg) e sacrificados 7 dias após administração do BrdU;
- Avaliar o efeito da Fisalina D, substância purificada do EA da *Physalis angulata*, sobre a expressão de células nestina positivas, no giro denteado hipocampal de camundongos sacrificados 24 horas após administração do BrdU;
- Avaliar o efeito da Fisalina D, sobre a expressão de células nestina positivas, em célula- tronco neural cultivado *in vitro*, derivado do giro denteado hipocampal de camundongos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. PLANTA MEDICINAL: PREPARAÇÃO DO EXTRATO AQUOSO E DA SUBSTÂNCIA PURIFICADA

A *Physalis angulata* foi coletada nas cidades de Belém, Castanhal e Bujaru no estado do Pará e, depositados no herbário João Murça Pires, do Museu Paraense Emilio Goeldi, Belém, PA, para identificação botânica pelo Dr. Ricardo Secco do Departamento de Botânica.

Após a limpeza e secagem do material vegetal, as partes utilizadas (raízes) foram trituradas e em seguida, 150g da amostra foram submetidas a um processo de decocção para a produção do EA. Este extrato foi concentrado para 15% do volume inicial e subseqüentemente congelado para posterior liofilização. O EA e a substância purificada, Fisalina D, foram gentilmente cedidos pela aluna de doutorado Danila Tavares que pertence ao Laboratório de Cromatografia Líquida do Instituto de Ciências Exatas e Naturais da Universidade Federal do Pará.

2.2. ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados camundongos machos adultos da linhagem BALB/c entre 6 a 8 semanas até o dia inicial do experimento. Estes 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.

2.3. ADMINISTRAÇÃO DA DROGA E DESENHO EXPERIMENTAL

Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais, controle e tratados com diferentes doses do EA da *Physalis angulata* (0,1; 1 e 5 mg/Kg) e da Fisalina D (5 mg/Kg) via intraperitoneal (i.p). Cinco horas após o tratamento com as drogas, os camundongos receberam i.p. uma única dose de 50mg/Kg de 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU; Sigma).

Em seguida, os animais foram sacrificados em diferentes períodos 24 horas e 7 dias após administração do BrdU, sendo perfundidos intracardialmente com solução salina (NaCl) 0.9% mais ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 1mM seguido de paraformaldeído (PFA, do

inglês Paraformaldehyde) 4%. Após a perfusão, os encéfalos foram dissecados e pós-fixados a 4°C em formaldeído 4% por 12 horas. Posteriormente, os encéfalos foram crioprottegidos em solução de sacarose 20% e mantidos também a 4°C. Em seguida, secções coronais de 40 µm do hipocampo foram realizadas a -20°C em criostato (Leica Microsystems), as quais foram colocadas em tampão fosfato salina (PBS, do inglês Phosphate Buffered Saline).

2.4. IMUNOFLOURESCÊNCIA PARA BrdU

Para a imunofluorescência do BrdU, os cortes de hipocampo foram tratados com ácido clórico (HCl) 2N a 37°C por 30 minutos, seguido da neutralização com borato de sódio ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) 0,15 M (pH 8.5) 2 vezes de 10 minutos. Em seguida, os cortes foram lavados com tampão tris salina (TBS; do inglês Tris-Buffered Saline) 0,1 M (pH 7.4) e bloqueados com TBS-plus (solução contendo 0,1% de Triton X-100, 3% de soro de cavalo dissolvido em TBS) por 2 horas em temperatura ambiente. Em seguida as fatias foram incubadas com anticorpo anti-BrdU (1:200; Abcam) overnight a 4°C. Em seguida as amostras foram incubadas com anticorpo secundário Alexa Fluor 568 (1:400) por 2 horas em temperatura ambiente.

2.5. QUANTIFICAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS BrdU POSITIVAS

O número de células BrdU marcadas foram quantificadas usando objetiva de 10X (Olympus BX41), através da extensão rostrocaudal do GD. A quantificação das células BrdU positivas foi feita na ZSG, sendo definida como uma zona com uma largura de dois corpos celulares (aproximadamente 10 µm) ao longo da borda entre a camada granular e o hilo.

2.6. IMUNOFLOURESCÊNCIA PARA CÉLULAS-TRONCO DIFERENCIADAS

As amostras imunomarcadas para BrdU foram posteriormente processadas para dupla marcação, sendo incubadas com anticorpo anti-proteína glial fibrilar ácida (GFAP; do inglês Glial Fibrillary Acidic Protein) (1:200; Sigma-Aldrich); anti-proteína neuronal específica de neurônio (NeuN; do inglês Neuronal Nuclei) (1:200; Chemicon) ou anti-nestina (1:200; Millipore), proteína de filamento intermediário, como consta na tabela a seguir as relações

de anticorpos primários e secundários. Em seguida, as amostras foram incubadas com anticorpo secundário conforme a especificidade do anticorpo primário utilizado. A tabela abaixo indica a relação de anticorpos primários, secundários e respectiva solução de bloqueio utilizada. A análise das células foi realizada em microscopia confocal.

Anticorpo Primário	Anticorpo Secundário	Solução de Bloqueio
Anti-NeuN (1:200)	Alexa Fluor 488 anti-mouse (1:400)	TBS-plus (soro de cavalo)
Anti-GFAP (1:200)	Alexa Fluor 488 anti-rabbit (1:400)	TBS-plus (soro de cavalo)
Anti-nestina (1:200)	Alexa Fluor 568 anti-rat (1:400)	TBS-plus (soro de cavalo)

2.7. CULTURA DE CÉLULAS-TRONCO NEURAIIS DO HIPOCAMPO

As CTNs hipocampais foram isoladas e propagadas pelo método da neuroesfera, de embriões de camundongos da linhagem BALB/c com 15.5 dias. Os tecidos do hipocampo foram cuidadosamente dissecados e dissociados mecanicamente com uma pipeta de plástico para obter uma suspensão de células em meio MHM (do inglês media-hormone mix) que é DMEM/F12 (do inglês Dulbecco's modified Eagle's medium) suplementado com glicose 0,34%; insulina 23µg/mL; transferrina 92µg/mL; putrescina 55µM; selenito de sódio 27,5 nM; progesterona 20nM; penicilina 50U/mL; estreptomina 50µg/mL. As células viáveis foram dissociadas a uma densidade de 4×10^5 células/mL em meio contendo EGF [Fator de crescimento epidérmico] (20ng/mL) e FGF-2 [Fator de crescimento de fibroblastos] (20ng/mL). Semeadas em frasco de cultura T75 e mantidas em uma incubadora umidificada a 37°C com 95% do ar atmosférico e 5% de CO₂. As células em seguida foram incubadas por 7 dias para formação de um número suficiente de neuroesferas e após este período foram colocadas em placas pré-tratadas com 30 µg/ml de poli-L-lisina.

2.8. IMUNOCITOQUÍMICA PARA NESTINA

As CTNs foram tratadas com meio na ausência de EGF durante 2 horas, em seguida fixadas com PFA 4% por 15 minutos e lavados com PBS. Posteriormente as células foram incubadas com anticorpo primário anti-nestina (1:200; Millipore) seguido do anticorpo secundário (Alexa Fluor 568 anti-rat) e 1 mg/ml de Hoechst 33258.

2.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliação estatística dos resultados foi realizada análise de variância (ANOVA) das médias amostrais seguidas pelo pós- teste *t* de Student, através do programa BioEstat 5.0.

3. RESULTADOS

3.1. *Physalis angulata* ESTIMULA PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO NEURAIS.

Para analisar o período de proliferação das CTNs no GD hipocampal de camundongos adultos, o sacrifício dos animais 24 horas após uma única administração intraperitoneal do BrdU é fundamental para estabelecer uma análise temporal da neurogênese hipocampal. Desta forma para determinar o efeito proliferativo do EA da *Physalis angulata* sobre a proliferação de CTNs no GD, foi realizada a análise quantitativa do número de células BrdU positivas nesta região.

Utilizando diferentes doses do EA (0,1; 1 e 5 mg/Kg), foi possível observar um aumento significativo do número de células BrdU positivas no GD dos grupos tratados com a droga em relação ao grupo controle [Controle, 92 ± 24 (n=9); EA 0,1mg/Kg, 160 ± 22 (n=4); EA 1mg/Kg, 310 ± 5 (n=4); EA 5mg/Kg, 501 ± 24 (n=3); (Figura 8)].

O efeito proliferativo do EA ocorreu de forma dose dependente, ou seja, quanto maior a dose do EA maior o número de células BrdU positivas quantificadas no GD do hipocampo, sendo que o maior número de células BrdU positivas ocorreu nos animais que receberam a dose de 5 mg/Kg de EA.

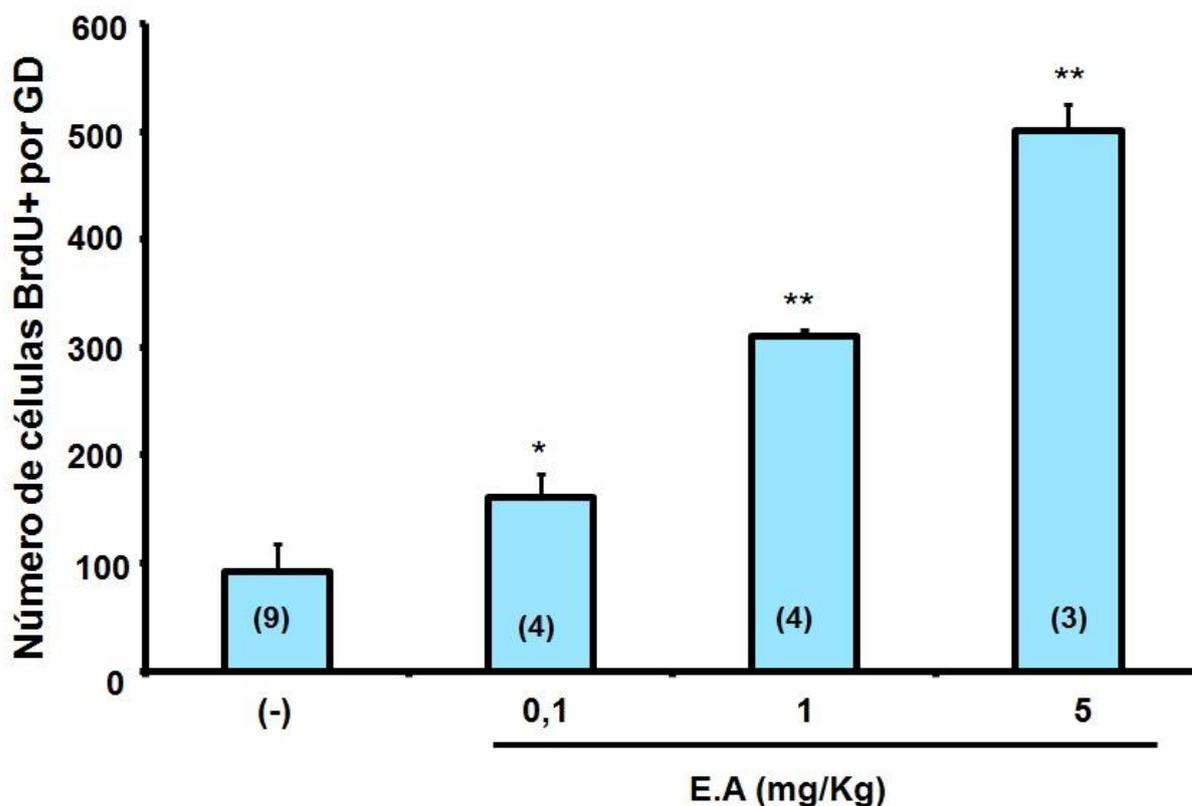


Figura 8 - Efeito proliferativo do EA da *Physalis angulata* sobre as células-tronco neurais do GD hipocampal de camundongos adultos da linhagem BALB/c. Quantificação de células BrdU positivas no giro denteado, nos grupos tratados com diferentes doses do EA houve um aumento significativo do número de células BrdU+ comparado ao grupo controle (salina), quando os animais foram sacrificados 24 horas após administração do BrdU (dose única). Os dados são representados com a média \pm erro padrão e o número entre parênteses indica a quantidade de animais em cada grupo. O asterisco (* $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$) representa uma diferença significativa em relação ao controle por ANOVA um critério seguido por pós-teste *t* de Student.

A análise qualitativa das imagens representativas da imunofluorescência para BrdU no GD hipocampal de camundongos adultos, tratados com salina (grupo controle) e com diferentes doses do EA (0,1; 1 e 5 mg/Kg), mostram a marcação de células BrdU+ (vermelho) na ZSG do GD como é possível constatar na visualização da imagem ampliada de um determinado campo do GD dos diferentes grupos experimentais (Fig.9).

Nos animais que receberam a dose de 0,1 mg/Kg do EA foi possível observar a formação de cluster de células localizado no GD e com a ampliação da imagem foi possível visualizar todas as células presentes no cluster (Fig.9).

No grupo tratado com a dose de 1 mg/Kg do EA as células BrdU positivas (vermelho) aparecem distribuídas ao longo de todo o GD hipocampal e também observa-se a formação de um cluster de células, como é possível confirmar na ampliação de uma parte do GD (Fig.9).

No grupo que recebeu 5 mg/Kg do EA é possível visualizar a distribuição de células BrdU+ (vermelho) também ao longo do GD hipocampal, como também foi possível visualizar em uma ampliação da imagem (Fig.9).

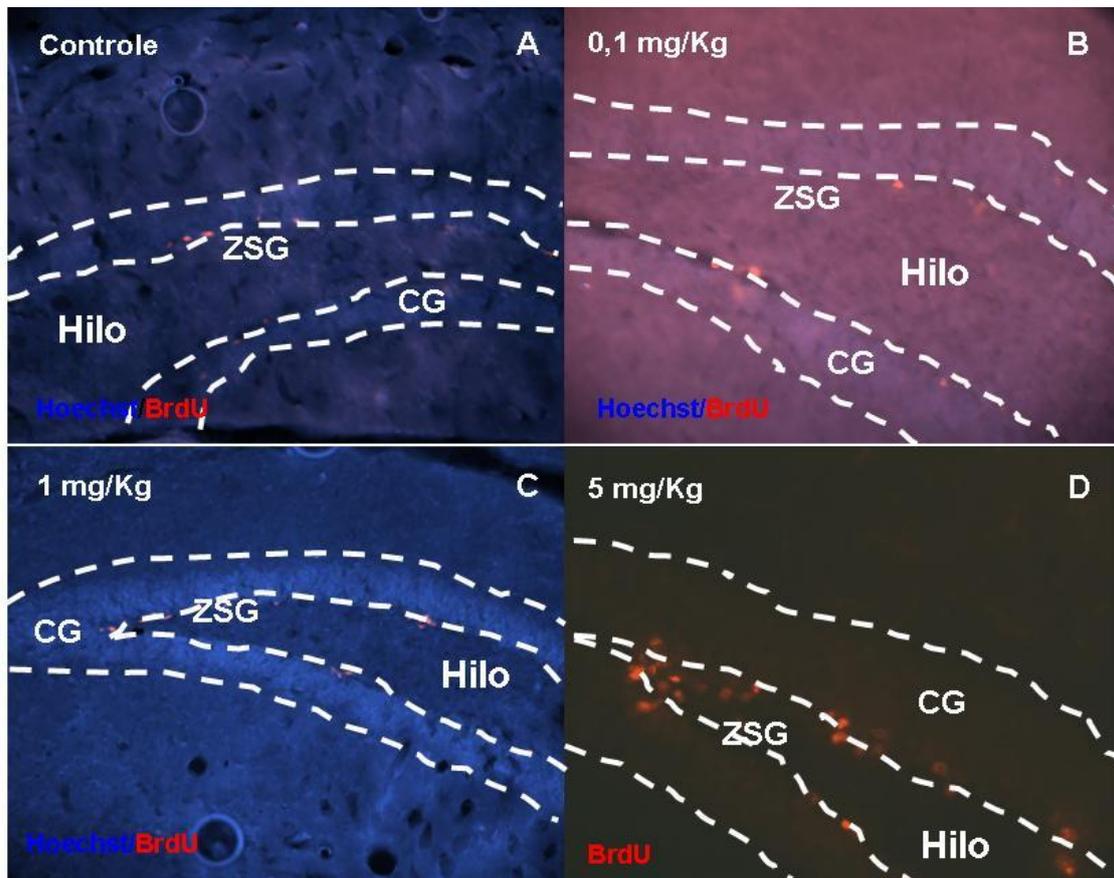


Figura 9. Imagens representativas da imunofluorescência para BrdU de animais sacrificados 24 horas após administração do BrdU. Imunofluorescência para BrdU (vermelho) obtidas do GD do hipocampo de camundongos adultos sacrificados 24 horas após administração intraperitoneal do BrdU. **(A)** Giro dentado dos animais tratados com salina; **(B,C,D)** Giro dentado dos animais tratados com 0,1, 1 e 5 mg/Kg do EA da *Physalis angulata*, respectivamente e sacrificados 24 horas após administração intraperitoneal do BrdU. Barra = 50 µm.

3.2. E.A AUMENTA O NÚMERO DE CÉLULAS BrdU POSITIVAS NA ZSG.

Sabendo do efeito do EA sobre a proliferação das CTNs no GD, nosso próximo passo foi investigar qual a região do GD de camundongos adultos, o EA estimula a proliferação celular utilizando as mesmas amostras dos animais sacrificados 24 horas após administração única de BrdU, contamos o número de células BrdU+ nas diferentes regiões que constituem o GD (camada molecular, camada de células granulares, zona subgranular e hilo).

As regiões do GD foram localizadas a partir da zona subgranular, que é definida como uma zona com largura de dois corpos celulares (aproximadamente 10 μm), que se estende ao longo da borda entre a camada de células granulares e o hilo.

O EA aumentou significativamente o número de células BrdU positivas no GD hipocampal na presença das diferentes doses (0,1; 1 e 5 mg/Kg) do EA, em comparação ao grupo controle, atuando única e exclusivamente na ZSG (Tabela 1), esta região correspondente ao local de proliferação das CTNs que se dividem e migram para a camada de células granulares podendo originar neurônios ou astrócitos.

Regiões do GD hipocampal	Controle	0,1 mg/Kg	1 mg/Kg	5 mg/Kg
Zona Subgranular	93±25	161±22*	311±5*	502±24*
Camada Granular	2±1	3±1	2±1	0±0
Camada Molecular	0±0	0±0	0±0	0±0
Hilo	1±1	1±0	1±0	0±0

Tabela 1. Efeito do EA da *Physalis angulata* sobre o número de células BrdU positivas na zona subgranular. Quantificação de células BrdU+ nas quatro regiões que compõem o GD hipocampal de camundongos adultos da linhagem BALB/c. Nos grupos tratados com diferentes doses do EA houve um aumento significativo do número de células BrdU+ comparado ao grupo controle (salina) somente na zona subgranular do GD, quando os animais foram sacrificados 24 horas após administração do BrdU (dose única). Os dados são representados com a média± erro padrão. O asterisco (* $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$) representa uma diferença significativa em relação ao controle por ANOVA um critério seguido por pós-teste *t* de Student.

3.3. EA AUMENTA O NÚMERO DE CÉLULAS BrdU POSITIVAS DURANTE O PERÍODO DE DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO NEURAIS.

O resultado de dose resposta do EA mostrou que a dose mais eficaz para estimular a proliferação de CTNs no GD, 24 horas após administração i.p. do BrdU (50 mg/Kg), foi a dose de 5 mg/Kg. Diante deste achado, partimos para investigar qual o efeito do E.A. (5mg/Kg) sobre as CTNs do GD de camundongos adultos sacrificados 7 dias após administração do BrdU (i.p.), sendo que este período corresponde a etapa de diferenciação das CTNs.

Para determinar se o EA na dose de 5 mg/Kg aumenta o número de células BrdU positivas no GD, foi feita a contagem do número de células BrdU positivas nessa região. É possível constatar que o EA promoveu um aumento significativo do número de células BrdU+ nos animais tratados em relação ao grupo controle [controle, 107 ± 7 (n=4) e EA 5 mg/Kg, 146 ± 24 (n=4) (Figura 10)].

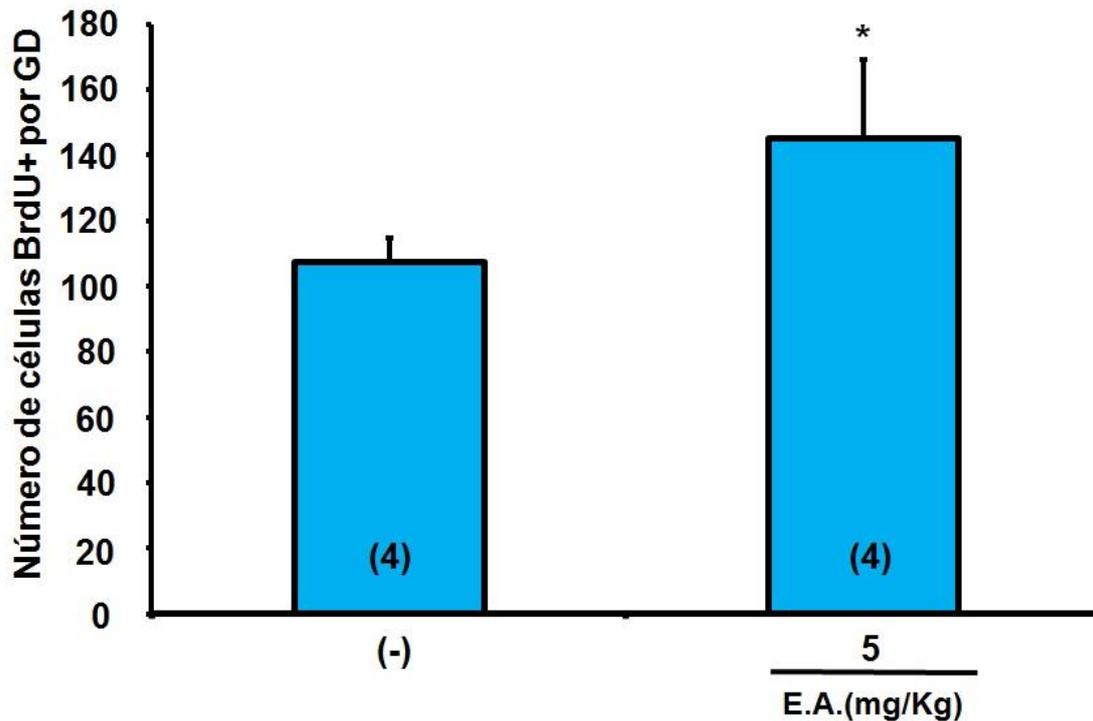


Figura 10. Efeito do EA da *Physalis angulata* sobre o número de células BrdU positivas no GD hipocampal de camundongos adultos da linhagem BALB/c. Quantificação de células BrdU+ no grupo tratado com 5 mg/Kg do EA houve um aumento significativo do número de células BrdU+ comparado ao grupo controle (salina), quando os animais foram sacrificados 7 dias após administração do BrdU (dose única). Os dados são representados com a média \pm erro padrão, e o número entre parêntese indicam a quantidade de animais em cada grupo. O asterisco (* $P < 0,05$) representa uma diferença significativa em relação ao controle por ANOVA um critério seguido por pós-teste *t* de Student.

A análise qualitativa das imagens representativas da imunofluorescência para BrdU no GD hipocampal de camundongos adultos, tratados com salina (grupo controle) e com a dose de 5 mg/Kg do EA, mostram a marcação de células BrdU+ (vermelho) na ZSG do GD como é possível constatar na visualização da imagem do GD dos animais, sendo em azul a coloração com Hoechst 33258, marcador de núcleo celular (Fig. 11).

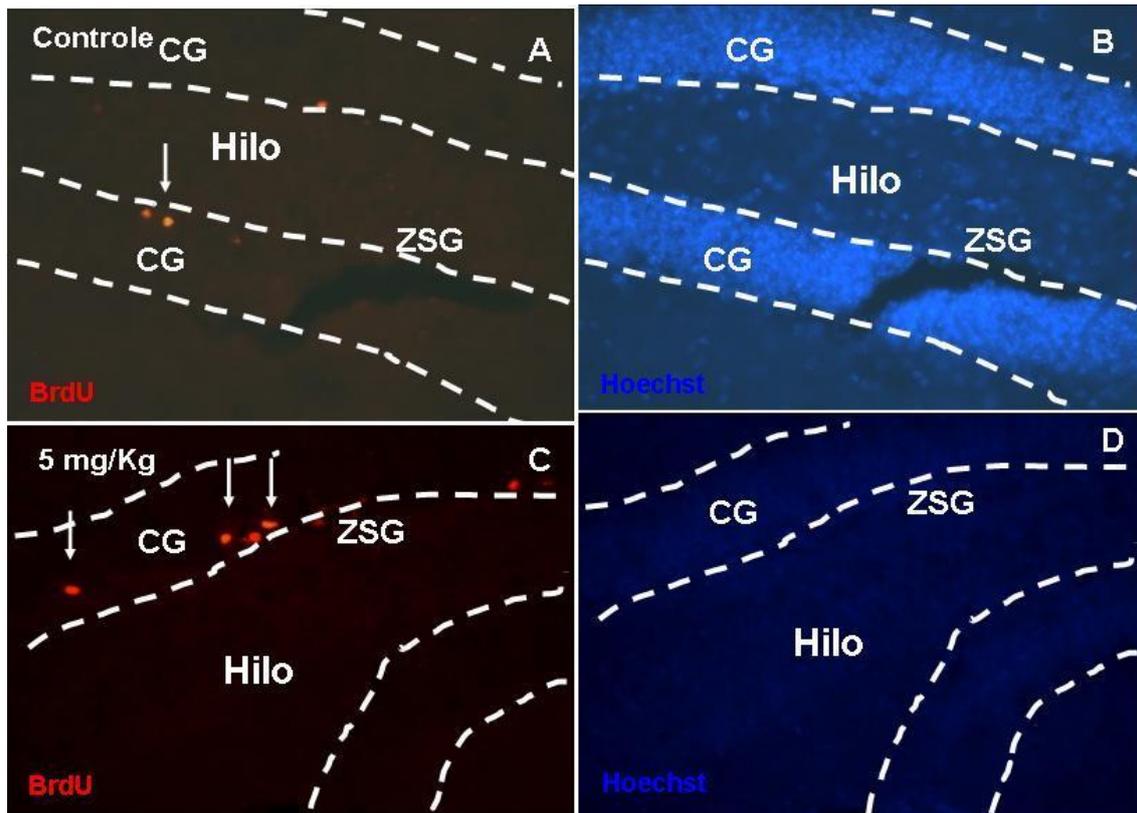


Figura 11. Imagens representativas da imunofluorescência para BrdU de animais sacrificados 7 dias após administração do BrdU. Imunofluorescência para BrdU (vermelho) obtidas do GD do hipocampo de camundongos adultos sacrificados 7 dias após administração intraperitoneal do BrdU. **(A, B)** Giro denteado dos animais tratados com salina; **(C, D)** Giro denteado dos animais tratados com 5 mg/Kg da EA da *Physalis angulata* e sacrificados 7 dias após administração intraperitoneal do BrdU. Barra = 50 µm.

3.4. EFEITO DO TRATAMENTO COM EA NA DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO NEURAIS.

Diante dos resultados do efeito proliferativo do EA *Physalis angulata* sobre as CTNs (período de 24 horas após administração do BrdU) e do aumento do número de células BrdU+ no GD hipocampal de camundongos adultos (período de 7 dias após administração do BrdU). O próximo passo foi verificar qual o efeito do EA sobre a diferenciação das CTNs no GD hipocampal de camundongos adultos.

Para buscar os resultados foram realizados duplas marcações para BrdU/GFAP (corresponde ao marcador de astrócitos) e BrdU/NeuN (um marcador de neurônio maduro), para as amostras do GD hipocampal de camundongos do grupo controle e tratado com E.A. (5 mg/Kg) de animais sacrificados 7 dias após administração do BrdU.

A análise qualitativa das imagens representativas do BrdU/GFAP (Fig.12) mostram a ausência de células duplamente marcadas, tanto no controle como no grupo tratado com EA (5 mg/Kg), já nas imagens representativas do BrdU/NeuN (Fig.13), verifica-se células duplamente marcadas apenas no grupo tratado com EA também com uma dose de 5 mg/Kg.

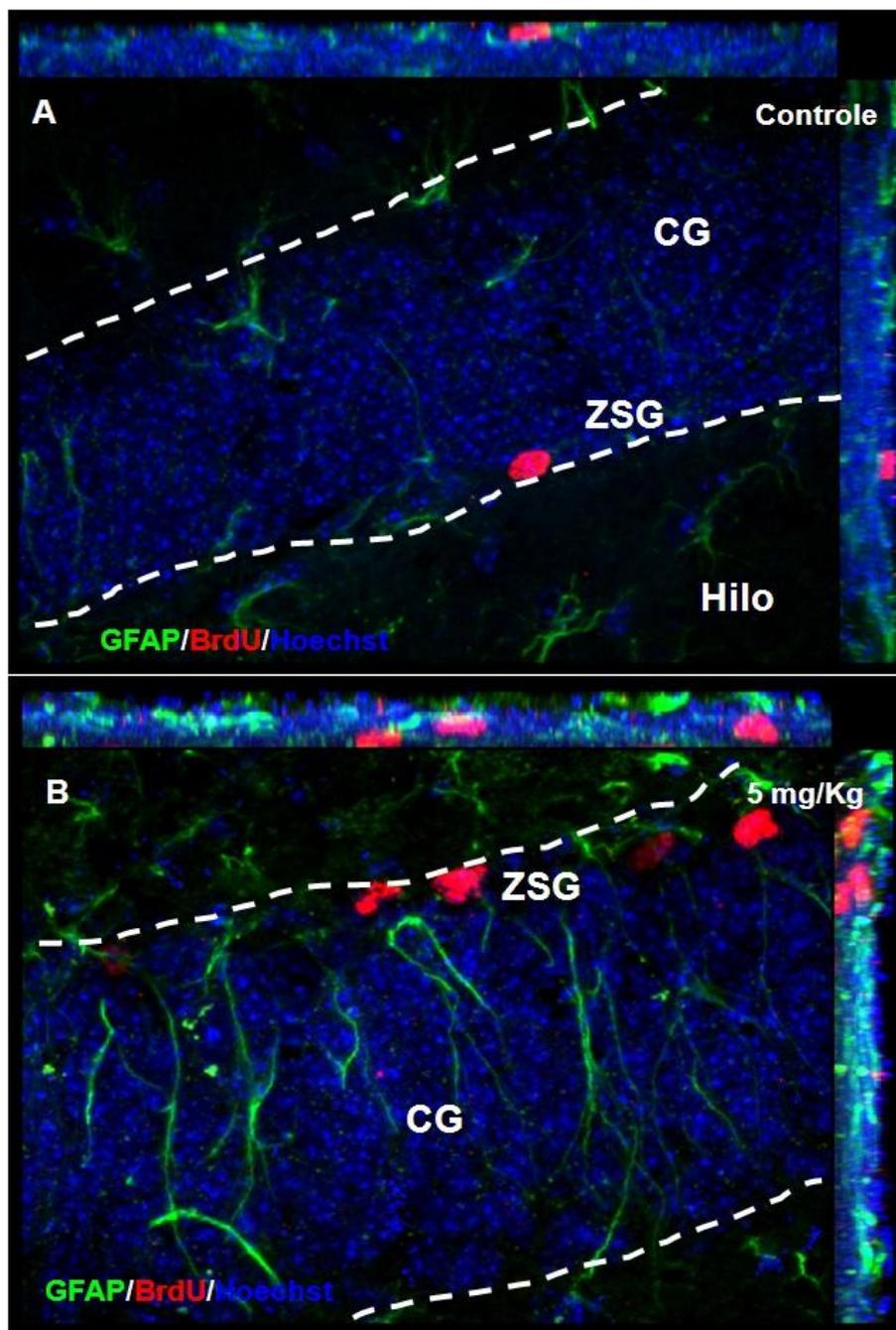


Figura 12. Imagens representativas da imunofluorescência para dupla marcação GFAP/BrdU. Imunofluorescência para GFAP (verde) e BrdU (vermelho) obtidas do GD do hipocampo de camundongos adultos sacrificados 7 dias após administração intraperitoneal do BrdU. **(A)** Giro denteado dos animais tratados com salina; **(B)** Giro denteado dos animais tratados com 5 mg/Kg da EA da *Physalis angulata* e sacrificados 7 dias após administração intraperitoneal do BrdU. Barra 50 μ m.

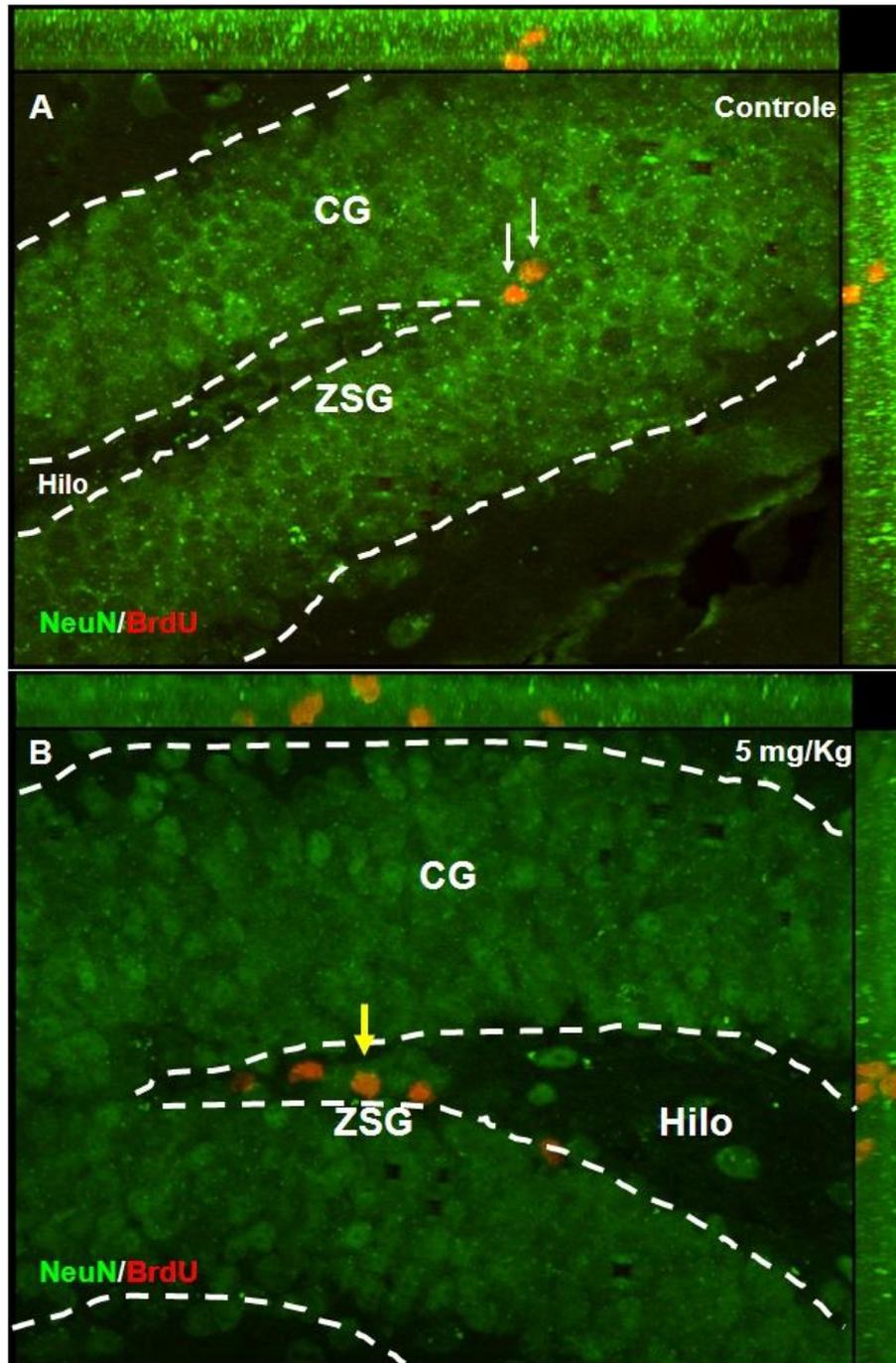


Figura 13. Imagens representativas da imunofluorescência para dupla marcação NeuN/BrdU. Imunofluorescência para NeuN (verde) e BrdU (vermelho) obtidas do GD do hipocampo de camundongos adultos sacrificados 7 dias após administração intraperitoneal do BrdU. **(A)** Giro denteado dos animais tratados com salina; **(B)** Giro denteado dos animais tratados com 5 mg/Kg EA da *Physalis angulata* e sacrificados 7 dias após administração intraperitoneal do BrdU. A seta amarela indica célula BrdU/NeuN positiva. Barra 50 μm.

3.5. FISALINA D ESTIMULA PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO NEURAIS.

Os resultados obtidos durante os experimentos fazem referência ao EA da *Physalis angulata* promovendo um aumento do número de células BrdU+ no GD hipocampal de camundongos adultos. Contudo, por ser um EA este pode ser constituído de um universo de moléculas bioativas.

Portanto foi de fundamental importância investigar quais os efeitos da Fisalina D sobre a proliferação de CTNs do GD hipocampal de camundongos adultos. Os animais receberam uma dose de 5 mg/Kg (i.p.) da substância purificada do EA e foram sacrificados 24 horas após administração do BrdU, desta forma houve um aumento significativo do número de células BrdU+ no grupo tratado com a substância purificada, Fisalina D, em comparação ao grupo controle [Controle, 92 ± 24 (n=9); Fisalina D 5mg/Kg, 316 ± 37 (n=3); (Figura 14)].

A substância purificada, Fisalina D, do EA da *Physalis angulata* compreende a substância presente em maior quantidade no extrato, sendo assim ela também estimulou a proliferação de CTNs no GD hipocampal de camundongos adultos, ao utilizar a mesma dose de 5 mg/kg do EA.

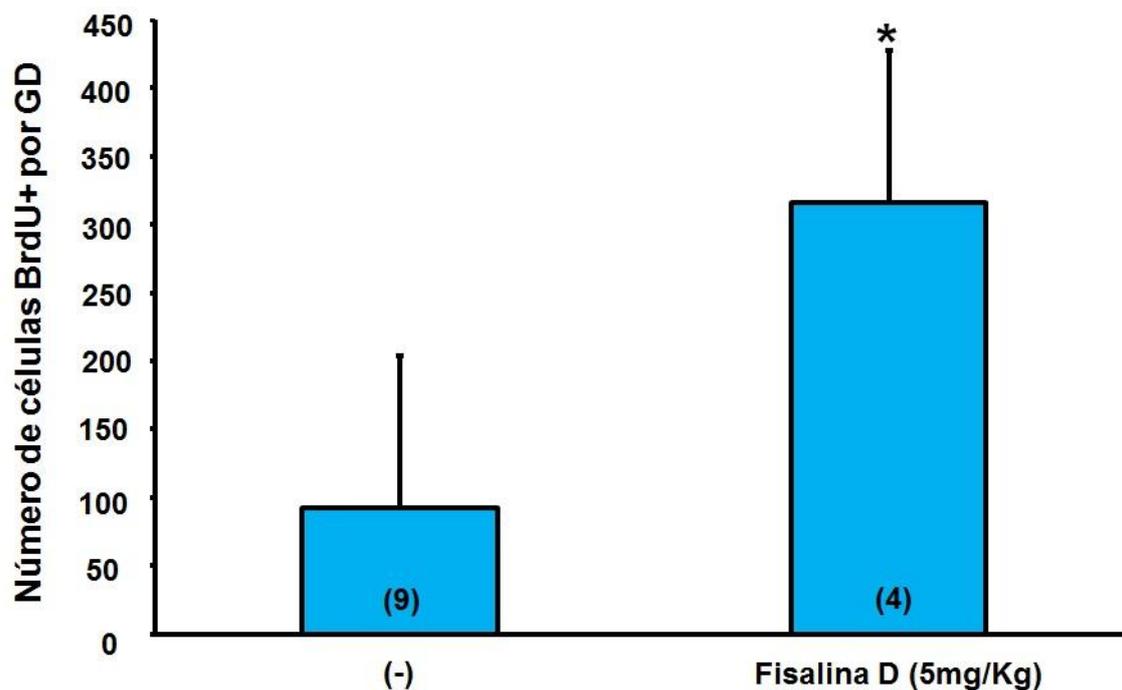


Figura 14. Efeito da substância purificada do EA da *Physalis angulata*, Fisalina D, sobre o número de células BrdU+ no GD hipocampal. Quantificação de células BrdU positivas no GD de camundongos adultos da linhagem BALB/c. No grupo tratado com 5 mg/Kg da Fisalina D houve um aumento significativo do número de células BrdU+ comparado ao grupo controle (salina), quando os animais foram sacrificados 24 horas após administração do BrdU (dose única). Os dados são representados com a média \pm erro padrão, e o número entre parêntese indica a quantidade de animais em cada grupo. O asterisco ($*P < 0,05$) representa uma diferença significativa em relação ao controle por ANOVA um critério seguido por pós-teste *t* de Student.

3.6. FIALINA D AUMENTA EXPRESSÃO DE NESTINA *IN VIVO* E *IN VITRO*

Partindo do princípio que a Fialina D é a molécula responsável em promover os efeitos biológicos sobre as CTNs do GD hipocampal de camundongos adultos, a próxima etapa do trabalho foi verificar a expressão da nestina no GD hipocampal de camundongos sacrificados 24 horas após administração i.p do BrdU.

A análise qualitativa das imagens representativas da imunoflorescência para nestina no GD hipocampal de camundongos mostram um aumento da expressão de células nestina positivas no GD hipocampal de camundongos tratados com 5 mg/Kg da Fialina D em relação ao grupo controle (Fig.15).

Em seguida como forma de confirmar o efeito da Fialina D, sobre a expressão de células nestina positivas, foram feitos os tratamentos das CTNs com Fialina D (10 μ M). A análise qualitativa das imagens representativas da imunoflorescência para nestina na cultura de CTNs também mostram um aumento da expressão de células nestina positivas, quando as CTNs foram tratadas com 10 μ M (Fig.16).

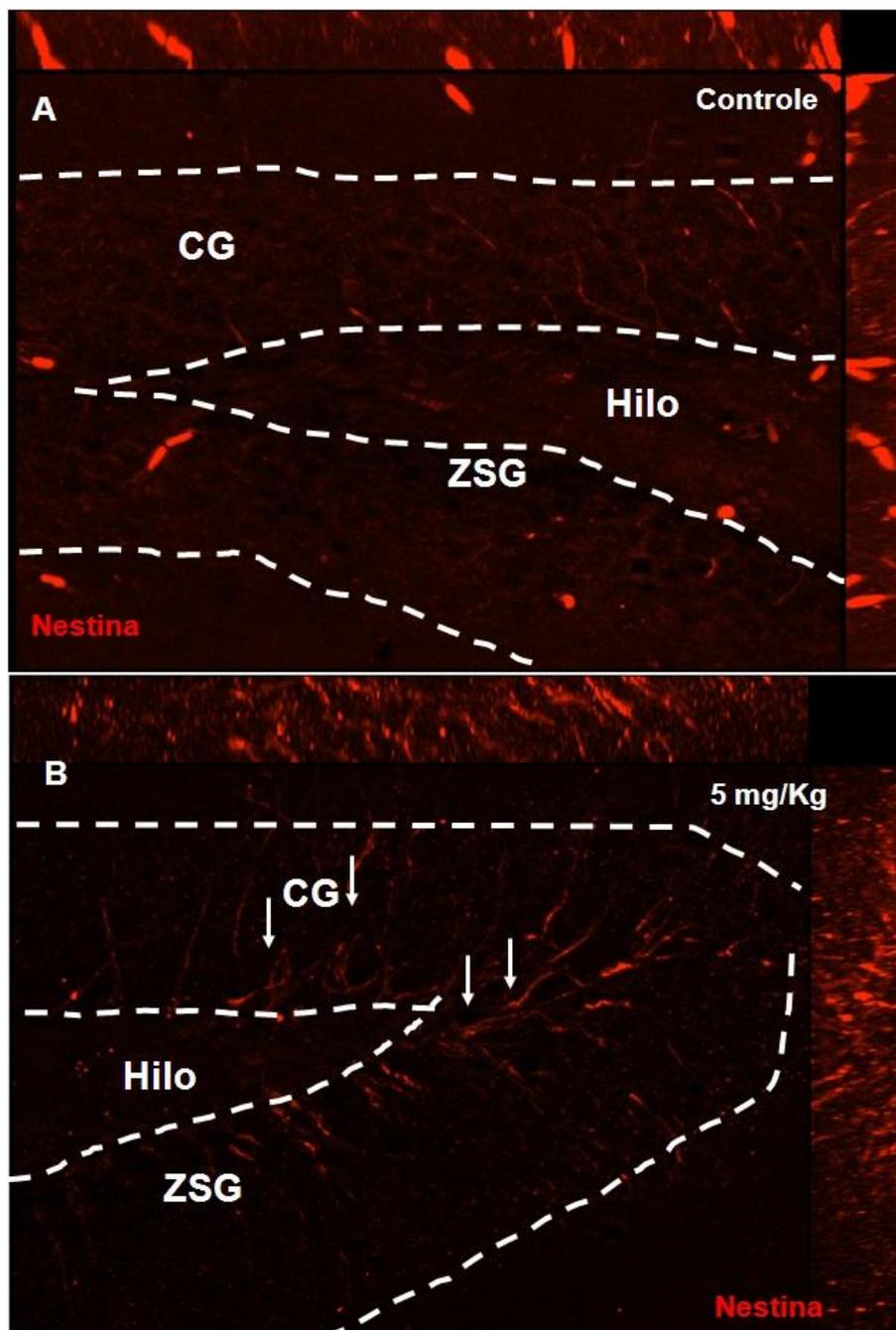


Figura 15. Imagens representativas da imunofluorescência para nestina. Imunofluorescência para nestina no GD do hipocampo de camundongos adultos sacrificados 24 horas após administração intraperitoneal do BrdU. **(A)** Giro denteado dos animais tratados com salina; **(B)** Giro denteado dos animais tratados com 5 mg/Kg da Fisalina D e sacrificados 24 horas após administração intraperitoneal do BrdU. Barra 50 μ m.

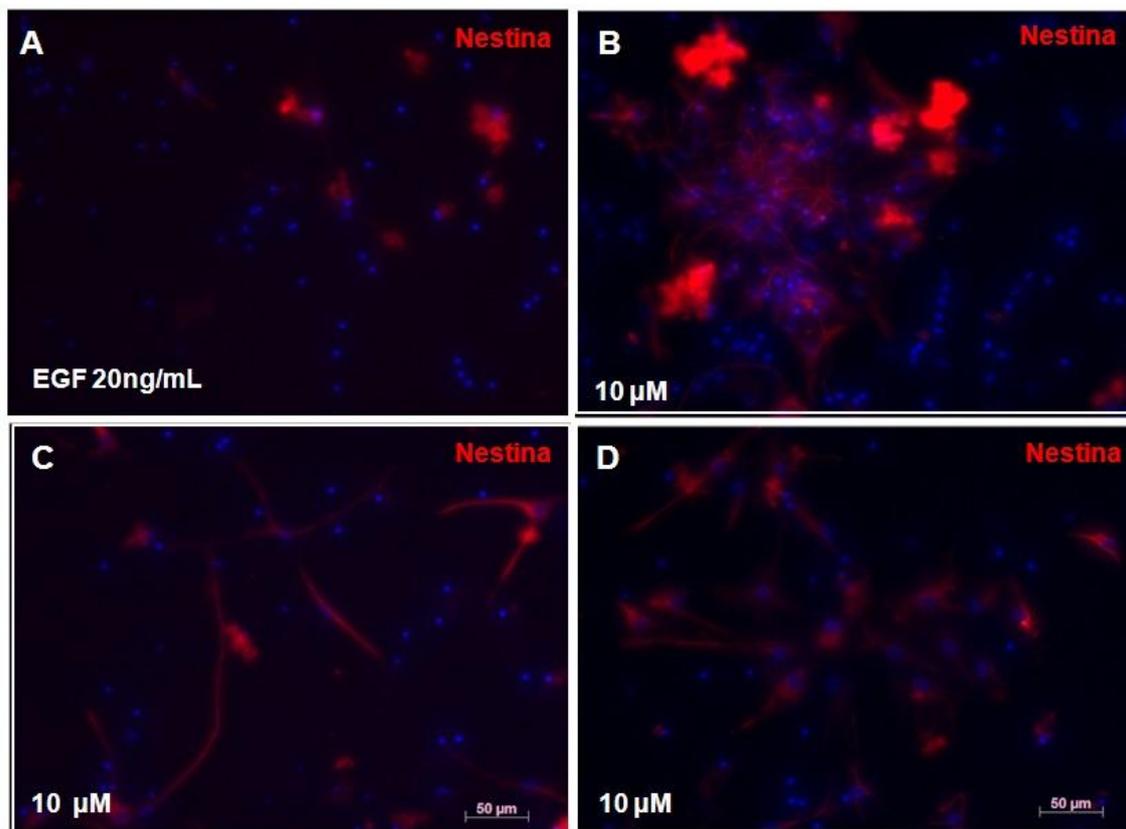


Figura 16. Imagens representativas da imunofluorescência para nestina em cultura de CTNs. As CTNs foram tratadas com 10 μ M da Fisalina D por 96 horas e em seguida foram fixadas com PFA, para posterior imunocitoquímica. **(A)** CTNs tratadas apenas com EGF (20 ng/ml), como grupo controle; **(B,C e D).** CTNs tratadas com Fisalina D (10 μ M). Barra 50 μ m.

4. DISCUSSÃO

O presente estudo investigou os possíveis efeitos neurogênicos do EA da *Physalis angulata* e da fisalina D, sobre a neurogênese do GD hipocampal de camundongos adultos. Usando como método principal uma única administração sistêmica de BrdU (50 mg/Kg), é observado que o EA da *Physalis angulata*, diferentes doses (0,1; 1 e 5 mg/Kg), administrado i.p em camundongos adultos aumentou o número de células BrdU positivas no GD do hipocampo de animais sacrificados 24 horas após administração do BrdU, sendo o aumento dose-dependente.

O sacrifício dos animais em diferentes períodos é fundamental para estabelecer qual etapa da neurogênese hipocampal estava sendo investigado, desta forma Bastos e colaboradores (2008) mostraram que o sacrifício de camundongos, 24 horas após administração do BrdU (i.p) compreende ao período de proliferação das CTNs no GD hipocampal desses animais.

O BrdU, corresponde ao análogo sintético da timidina, incorpora-se ao material genético das células durante a fase S do ciclo celular (Gratzner, 1982). A quantificação das células BrdU+ no GD hipocampal de camundongos adultos representam as CTNs que estavam em proliferação nessa região do cérebro de camundongo (Mandyam et al., 2007).

Com isso, esses resultados mostram que ao sacrificar os animais 24 horas após administração (i.p) do BrdU, é possível observar em uma análise quantitativa o aumento de células BrdU+ no GD dos grupos tratados em relação aos animais tratados apenas com salina. Esses resultados sugerem que o EA da *Physalis angulata* estimula a proliferação das CTNs no GD hipocampal de camundongos adultos, sendo que o maior número de células BrdU positivas foram observados em animais tratados com uma dose de 5 mg/Kg do EA da *Physalis angulata*.

Conforme Kronenberg et al. (2003), uma única injeção sistêmica do BrdU na dose de 50mg/Kg é suficiente para a incorporação desse marcador exógeno e posterior contagem das CTNs em proliferação no GD hipocampal de camundongos adultos.

O EA *Physalis angulata* atuou estimulando a proliferação das CTNs, administrando o EA (i.p) em diferentes doses de 0,1; 1 e 5 mg/Kg, ao contrário do extrato das folhas do *Ginkgo biloba* que apresenta uma possível propriedade neurogênica, o extrato foi administrado oralmente, contudo necessitou de doses maiores, como 40 e 100 mg/Kg, para aumentar a proliferação de CTNs no GD de camundongos adultos da linhagem C57/BL6. (Yoo et al., 2010).

Apesar disso, o EA da *Physalis angulata* pode ser mais eficaz, pois apresentou efeitos similares, com doses 10 vezes menores e com apenas uma aplicação, diferente do extrato de *Ginkgo biloba* que foi administrado diariamente nos camundongos durante um período de 28 dias (Yoo et al., 2010).

O EA também teve um efeito similar de drogas utilizadas no tratamento da depressão, os chamados medicamentos antidepressivos como, por exemplo, a fluoxetina, um inibidor seletivo da recaptação de serotonina, cujo tratamento crônico com a dose de 1mg/Kg desse antidepressivo químico aumentou significativamente a proliferação de células BrdU positivas, em ratos adultos sacrificados 24 horas após administração do BrdU (Malberg et al., 2000).

Sabendo que o EA da *Physalis angulata* aumentou o número de células BrdU positivas no GD de camundongos adultos, o próximo passo foi investigar qual região do GD o EA estaria promovendo o aumento de células BrdU+, quando os animais foram sacrificados 24 horas após administração i.p do BrdU (Tabela 1).

O EA atuou única e exclusivamente na ZSG do GD hipocampal de camundongos adultos, sendo bem estabelecido na literatura que essa região do GD compreende o nicho de proliferação das CTNs no GD hipocampal de ratos e camundongos (Cameron & McKay, 2001; Seri et al., 2004).

Diferente do que ocorre em doenças que afetam o SNC, como a epilepsia, modelos animais de epilepsia induzidos pelo uso de drogas como a pilocarpina (Walter et al., 2007), que promove um aumento na proliferação de progenitores neurais, porém esse aumento é acompanhado da morfogênese

anormal dos neurônios recém formados e também por um processo caracterizado como neurogênese ectópica, ou seja, a origem de neurônios em regiões não neurogênicas, estabelecendo conexões anormais com as outras regiões hipocampais (Jessberger et al., 2007).

O presente resultados mostrou que o EA da *Physalis angulata* promoveu um aumento de células BrdU positivas exclusivamente na ZSG do GD hipocampal, indicam uma ação específica do EA sobre a ZSG, potencializando a capacidade proliferativa das CTNs nessa região do GD, atuando diferente da pilocarpina que também promove um aumento de células BrdU+, mas com estabelecimento de neurogênese ectópica. (Walter et al., 2007).

Sabendo do efeito proliferativo do EA da *Physalis angulata* sobre as CTNs do GD hipocampal de camundongos adultos sacrificados após 24 horas da injeção i.p do BrdU, o próximo passo foi investigar se o extrato da *Physalis angulata* possui algum efeito durante o período de diferenciação das CTNs no GD hipocampal de camundongos adultos sacrificados 7 dias após administração i.p de BrdU.

A análise quantitativa do número de células BrdU positivas durante o período de diferenciação das CTNs, ou seja, quando os animais foram sacrificados 7 dias após administração do BrdU (Mandyam et al., 2007), ainda mostrou um aumento significativo de células BrdU marcadas no grupo tratado com a dose de 5 mg/Kg do EA em relação ao grupo controle (Fig. 10). Mostrando que o EA possui efeito sobre as CTNs do GD do hipocampo tanto durante o período de proliferação como durante a diferenciação dessas células.

Diante desses resultados, foi necessário verificar quais linhagens celulares que compõem o SNC (Neurônios e astrócitos) poderiam ser formadas, a partir das CTNs, induzido pelo tratamento com a dose de 5 mg/Kg do EA da *Physalis angulata*. Com isso, foram realizadas duplas marcações de imunofluorescências para BrdU/GFAP (Fig. 12) e BrdU/NeuN (Fig. 13).

O NeuN é uma proteína específica de neurônios maduros (Mullen et al., 1992) e o GFAP é uma proteína expressa em astrócitos maduros (Song et al., 2002). Desta forma, utilizando dupla marcação para BrdU/GFAP não

constatou-se, através de uma análise qualitativa, células duplamente marcadas no GD hipocampal de camundongos tratados com EA da *Physalis angulata*, assim como nos animais do grupo controle (Fig.11).

Ao contrário do que foi observado nas imagens de imunofluorescência de BrdU/NeuN, onde é possível visualizar células duplamente marcadas para BrdU/NeuN no GD hipocampal de camundongos adultos tratados com EA da *Physalis angulata*, diferente do grupo controle em que não verificou-se células duplamente marcadas.

Esse resultado sugere que possivelmente o EA da *Physalis angulata* pode induzir a diferenciação das CTNs do GD hipocampal de camundongos adultos, na geração de novos neurônios no hipocampo, contudo não possível concluir que o extrato induz uma diferenciação das CTNs, pois não foi realizada análise quantitativa das células duplamente tanto para BrdU/GFAP e BrdU/NeuN.

Os resultados discutidos até o presente momento são referentes apenas à propriedade neurogênica do EA da *Physalis angulata*, no entanto por ser um EA este é constituído por um universo de biomoléculas (Vieira, et al., 2005; He et al., 2007; Guimarães et al., 2009; Pinto et al., 2010 e Yu et al., 2010). Portanto, foi de fundamental importância investigar o efeito proliferativo da Fisalina D, substância presente em maior quantidade no EA da *Physalis angulata* utilizado neste trabalho, sobre as CTNs.

Com isso, os animais tratados com a dose de 5 mg/Kg da Fisalina D e sacrificados 24 horas após uma única administração do BrdU i.p, ainda mostraram um efeito similar ao EA da *Physalis angulata*, ou seja, a Fisalina D promoveu um aumento significativo do número de células BrdU positivas no GD hipocampal de camundongos adultos.

Esse resultado sugere que administração i.p da Fisalina D, purificada do EA da *Physalis angulata*, estimula a proliferação de CTNs do GD hipocampal de camundongos adultos, apresentando um efeito similar ao observado com o EA da *Physalis angulata*. Desta forma, dentre as diversas moléculas presentes no EA da *Physalis angulata*, a Fisalina D possivelmente é a substância que esta modulando a neurogênese no GD hipocampal de camundongos adultos.

Partindo do princípio que a Fisalina D, presente no EA da *Physalis angulata*, pode ser a substância responsável por modular a neurogênese no hipocampo de camundongos e pensando na possibilidade de gerar novos fármacos que promovam a formação de novos neurônios no SNC de mamíferos adultos, realizamos a imunofluorescência para nestina no GD do hipocampo de camundongos adultos tratados com a Fisalina D (5 mg/Kg). Portanto constatou-se o aumento da expressão de nestina no GD hipocampal de camundongos sacrificados 24 horas após administração i.p do BrdU, que receberam uma dose de 5 mg/Kg da Fisalina D.

A nestina é uma proteína do filamento intermediário expresso em célula progenitora neural (Lendahl et al., 1990), sendo assim a nestina compreende um marcador para estudar a neurogênese hipocampal, pois as células nestina positivas estão envolvidas na formação de novos neurônios (Doyle et al., 2001 e Cao et al., 2006).

Os resultados mostram que a Fisalina D aumentou a expressão de células nestina positivas tanto no modelo *in vivo* como no modelo *in vitro*, possivelmente a Fisalina D purificada do EA da *Physalis angulata*, representa uma nova droga neurogênica, no entanto a realização de outros experimentos faz-se necessário para confirmação desses resultados preliminares.

Diversos grupos de pesquisas no mundo todo buscam novas drogas, tanto sintéticas como naturais, que possam modular de forma positiva o fenômeno da neurogênese hipocampal em mamíferos, principalmente que promovam a formação de novos neurônios no SNC desses animais (Kodama et al., 2004; Mandyam et al., 2004; Encinas et al., 2006; Yoo et al., 2008; Yabe et al., 2010; Yoo et al., 2011; Ma et al., 2013; Zhuang et al., 2013).

Diante desses resultados e do desafio global da neurociência no desenvolvimento de terapias alternativas para doenças que acometem o SNC, entre elas as doenças neurodegenerativas (Doença de Parkinson e Alzheimer), em que é bem caracterizada a morte de neurônios específicos de uma determinada região do cérebro (Lindvall et al., 2010).

O presente trabalho ainda busca quantificar as populações celulares (neurônios, astrócitos e/ou oligodendrócitos) que estão sendo formadas na presença do EA da *Physalis angulata* e da substância purificada, Fisalina D, tanto em camundongos adultos como em culturas de CTNs.

Estudos *in vitro* ainda tornam-se necessários, para identificação do mecanismo de ação da Fisalina D sobre a proliferação das CTNs e a possível diferenciação das CTNs em novos neurônios, sendo necessário caracterizar a funcionalidade dos tipos celulares originados das CTNs em proliferação.

A busca por uma droga neurogênica, tendo como contexto a biodiversidade da região Amazônica, permitiria a manutenção *in vitro* das CTNs hipocâmpais, promovendo diferenciação dessas células em novos neurônios. Portanto é de extrema importância a continuidade do presente estudo, para de alguma forma contribuir ao entendimento desse complexo processo de neurogênese no SNC de mamíferos adultos.

5. CONCLUSÃO

- O EA da *Physalis angulata* promoveu um aumento de células BrdU positivas na ZSG do GD hipocampal de camundongos adultos, quando os animais foram sacrificados 24 horas após administração i.p de 50mg/Kg de BrdU.
- O EA da *Physalis angulata* não promoveu distribuição ectópica das células BrdU positivas formadas no GD do hipocampo de camundongos adultos, sacrificados 24 horas após administração i.p do BrdU, mostrando uma proliferação essencialmente na ZSG, a região de proliferação das CTNs.
- O EA da *Physalis angulata* promoveu um aumento de células BrdU positivas no GD hipocampal de camundongos adultos, quando os animais foram sacrificados 7 dias após a administração i.p de 50mg/Kg de BrdU.
- As CTNs não diferenciaram em astrócitos na presença do EA da *Physalis angulata* no GD hipocampal em camundongos sacrificados 7 dias após administração do BrdU.
- As CTNs diferenciaram em neurônios na presença do EA da *Physalis angulata* no GD hipocampal em camundongos sacrificados 7 dias após administração do BrdU.
- A Fisalina D, substância purificada do EA da *Physalis angulata*, promoveu um aumento do número de células BrdU positivas no GD hipocampal de camundongos adultos, sacrificados 24 horas após administração i.p do BrdU.
- A Fisalina D promoveu um aumento da expressão de nestina no GD hipocampal de camundongos sacrificados 24 horas após administração do BrdU.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVAREZ-BUYLLA A, LIM DA. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. **Neuron**, 41, 683-686.2004.
- ALTMAN, J. Are new neurons formed in the brains of adult mammals? **Science** 135, 1127–1128.1962.
- ALTMAN J., DAS G.D., Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. **The Journal Comparative Neurology** 124, 319–336.1965.
- ALTMAN, J. & DAS, G. D. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. I. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in neonate rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. **The Journal of Comparative Neurology**, 126, 337–390.1966.
- ALTMAN, J.,. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. **The Journal of Comparative Neurology**, 137, 433–458.1969.
- AMARAL, DG.; LAVENEX, P. Hippocampal neuroanatomy. In: Andersen, P.; Morris, R.; Amaral, D.; Bliss, T.; O'Keefe, J., editors. *The Hippocampus Book*. Oxford University Press; New York: p. 37-114.2007.
- BASAK, O., AND TAYLOR, V., Stem cells of the adult mammalian brain and their niche. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 66, 1057–1072. 2009.
- BASTOS, G.N.T., SANTOS, A.R.S., FERREIRA, V.M.M., COSTA, A.M.R., BISPO, C.I., SILVEIRA, A.J.A., DO NASCIMENTO, J.L.M., . Antinociceptive effect of the aqueous extract obtained from roots of *Physalis angulata* L. on mice. **Journal of Ethnopharmacology**, 103, 241–245.2006a.
- BASTOS GN, SILVEIRA AJ, SALGADO CG, PICANÇO-DINIZ DL, DO NASCIMENTO JL., *Physalis angulata* extract exerts anti-inflammatory effects in rats by inhibiting different pathways. **Journal of Ethnopharmacology**, 118, 246-251.2008b.

- BASTOS GN, MORIYA T, INUI F, KATURA T, NAKAHATA N., Involvement of cyclooxygenase-2 in lipopolysaccharide-induced impairment of the newborn cell survival in the adult mouse dentate gyrus. **Neuroscience**, 155, 454-462.2008c.
- BURNS, K.A., KUAN, C.Y., Low doses of bromo- and iododeoxyuridine produce near-saturation labeling of adult proliferative populations in the dentate gyrus. **European Journal of Neuroscience**, 21, 803–807.2005.
- CACERES, A., MENENDEZ, H., MENDEZ, E., COHOBON, E., SAMAYOA, B.E., JAUREGUI, E., PERALTA, E., CARRILO, G., Antigonorrhoeal activity of plants used in Guatemala for the treatment of sexually transmitted diseases. **Journal of Ethnopharmacology**, 48, 85–88.1995.
- CAMERON, H.A., WOOLLEY, C.S., MCEWEN, B.S., GOULD, E., Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. **Neuroscience**, 56, 337–344.1993.
- CAMERON, H.A., MCKAY, R.D., Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. **The Journal of Comparative Neurology**, 435, 406–417.2001.
- CAO, F., HATA, R., ZHU, P., MA, Y.J., TANAKA, J., HANAKAWA, Y., HASHIMOTO, K., NIINOBE, M., YOSHIKAWA, K., SAKANAKA, M., Overexpression of SOCS3 inhibits astrogliogenesis and promotes maintenance of neural stem cells. **Journal of Neurochemistry**, 98, 459–470.2006.
- CHOI, E.M., HWANG, J.K., Investigations of anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Piper cubeba*, *Physalis angulata* and *Rosa hybrida*. **Journal of Ethnopharmacology**, 89, 171–175.2003.
- DE CASTRO, F., LÓPEZ-MASCARAQUE, L., AND DE CARLOS, J.A., Cajal: Lessons on Brain Development. **Brain Research Reviews**, 55, 481–489. 2007.
- DOYLE, K.L., KHAN, M., CUNNINGHAM, A.M., Expression of the intermediate filament protein nestin by sustentacular cells in mature olfactory neuroepithelium. **The Journal of Comparative Neurology**, 437, 186–195, 2001.

- ENCINAS, J.M., VAAHTOKARI, A., AND ENIKOLOPOV, G., Fluoxetine targets early progenitor cells in the adult brain. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 103, 8233–8238.2006.
- ERIKSSON, P.S., PERFILIEVA, E., BJORK-ERIKSSON, T., ALBORN, A.M., NORDBORG, C., PETERSON, D.A., GAGE, F.H., Neurogenesis in the adult human hippocampus. **Nature Medicine**, 4, 1313–1317.1998.
- FERREIRA, S. H., org. – Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil. Rio de Janeiro: **Academia Brasileira de Ciências**.1998.
- GAGE, F.H., Mammalian neural stem cells. **Science**, 287, 1433-1438.2000.
- GAGE, F.H., Neurogenesis in the adult brain. **The Journal of Neuroscience**, 22, 612–613.2002.
- GOULD, E., CAMERON, H.A., DANIELS, D.C., WOOLLEY, C.S., AND MCEWEN, B.S., Adrenal hormones suppress cell division in the adult rat dentate gyrus. **The Journal of Neuroscience**, 12, 3642–3650.1992.
- GOULD, E., BEYLIN, A., TANAPAT, P., REEVES, A., SHORS, T.J., Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. **Nature Neuroscience**, 2, 260–265.1999.
- GOULD, E., VAIL, N., WAGERS, M., GROSS, C.G., Adult-generated hippocampal and neocortical neurons in macaques have a transient existence. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, 98, 10910–10917.2001.
- GRATZNER, H.G., Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: a new reagent for detection of DNA replication. **Science** 218, 474–475.1982.
- GROSS, C.G., Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. **Nature Reviews Neuroscience**, 1, 67–73.2000.
- GUIMARÃES, E.T., LIMA, M.L., SANTOS, L.A., RIBEIRO, I.M., TOMASSINI, T.B.C., SANTOS, R.R.S., DOS SANTOS, W.L.C. AND SOARES, M.B.P., Activity of physalins purified from *Physalis angulata* in in vitro and in vivo

models of cutaneous leishmaniasis, **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 64, 84–87, 2009.

HAYES, N.L., NOWAKOWSKI, R.S., Dynamics of cell proliferation in the adult dentate gyrus of two inbred strains of mice. **Brain Research Developmental Brain Research**, 134, 77–85.2002.

HASTINGS, N. B., GOULD, E., Rapid extension of axons into the CA3 region by adult generated granule cells, **The Journal Comparative Neurology**, 413, 146–154.1999.

HE, Q.P., MA, L., LUO, J.Y., HE, F.Y., LOU, L.G. AND HU, L.H., Cytotoxic Withanolides from *Physalis angulata* L., **Chemistry & biodiversity** 4, 443-449, 2007.

HÖGLINGER, G.U., RIZK, P, Muriel, M. P., DUYCKAERTS, C., OERTEL W.H., CAILLE, I., AND HIRSCH E. C., Dopamine Depletion Impairs Precursor Cell Proliferation in Parkinson Disease. **Nature Neuroscience**, 7, 726–735.2004.

HUNZIKER, A.T., *The genera of Solanaceae*. Ruggell: A.R.G. Gantner Verlag K.G.2001.

JESSBERGER, S., ZHAO, C., TONI, N., CLEMENSON, G.D., JR., LI, Y., AND GAGE, F.H., Seizure-associated, aberrant neurogenesis in adult rats characterized with retrovirus-mediated cell labeling. **The Journal of Neuroscience**, 27, 9400–9407.2007.

KATURA, T., MORIYA, T., AND NAKAHATA, N., 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J2 Biphaseically Regulates the Proliferation of Mouse Hippocampal Neural Progenitor Cells by Modulating the Redox State. **Molecular Pharmacology**, 77, 601-611. 2010.

KEMPERMANN, G., KUHN, H.G., GAGE, F.H., More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. **Nature**, 386, 493–495. 1997.

KODAMA, M., FUJIOKA, T., AND DUMAN, R.S., Chronic Olanzapine or Fluoxetine Administration Increases Cell Proliferation in Hippocampus

and Prefrontal Cortex of Adult Rat, **Biological Psychiatry**, 56, 570-580, 2004.

KORNACK, D.R., RAKIC, P., Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, 96, 5768–5773.1999.

KRONENBERG, G., REUTER, K., STEINER, B., BRANDT, M.D., JESSBERGER, S., YAMAGUCHI, M., KEMPERMANN, G., Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli. **The Journal of Comparative Neurology**, 467, 455–463.2003.

KUAN, C.Y., SCHLOEMER, A.J., LU, A., BURNS, K.A., WENG, W.L., WILLIAMS, M.T., STRAUSS, K.I., VORHEES, C.V., FLAVELL, R.A., DAVIS, R.J., SHARP, F.R., RAKIC, P., Hypoxia–ischemia induces DNA synthesis without cell proliferation in dying neurons in adult rodent brain. **The Journal of Neuroscience**, 24, 10763–10772.2004.

KUHN, H.G., DICKINSON-ANSON, H., GAGE, F.H., Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. **The Journal of Neuroscience**, 16, 2027–2033.1996.

KUWABARA, T., HSIEH, J., MUOTRI, A., YEO, G., WARASHINA, M., LIE, D.C., MOORE, L., NAKARASHIMA, K., ASASHIMA, M., GAGE, F.H., Wnt-mediated activation of neuroD1 and retro-elements during adult neurogenesis. **Nature Neuroscience**, 12, 1097-1105.2009.

LIE, D.C., DZIEWCZAPOLSKI, G., WILLHOITE, A.R., KASPAR, B.K., SHULTS, C.W., GAGE, F.H., The adult substantia nigra contains progenitor cells with neurogenic potential. **The Journal of Neuroscience**, 22, 6639–6649.2002.

LIE, D.C., COLAMARINO, S.A., SONG, H.J., DESIRE, L., MIRA, H., CONSIGLIO, A., LEIN, E.S., JESSBERGER, S., LANSFORD, H., DEARIE, A.R., Wnt signaling regulates adult hippocampal neurogenesis. **Nature**, 437, 1370–1375.2005.

LLINÁS, R., 2003. The contribution of Santiago Ramón y Cajal to functional neuroscience. **Nature Reviews Neuroscience**, 4, 77–80.

- LIN, Y.S., CHIANG, H.C., KAN,W.S., HONE, E., SHIH, S.J.,WON, M.H., Immunomodulatory activity of various fractions derived from *Physalis angulata* L. extract. **The American Journal of Chinese Medicine** **20**, 233–243.1992.
- LINDVALL, O., KOKAIA, Z., Stem cell for the treatment of neurological disorders. **Nature**, 441, 1094-1996.2006.
- LINDVALL, O., KOKAIA, Z., Stem cells in human neurodegenerative disorders — time for clinical translation?. **The Journal of Clinical Investigation**, 120, 29-40.2010.
- LOIS, C. AND ALVAREZ-BUYLLA, A., Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 90, 2074–2077.1993.
- MA, T., GONG, K., YAN, Y., ZHANG, L., TANG, P., ZHANG, X., GONG, Y., Huperzine A promotes hippocampal neurogenesis *in vitro* and *in vivo*. **Brain Research**,1506, 35 – 43, 2013.
- MALBERG, J. E., EISCH, A. J., NESTLER, E. J., AND DUMAN, R. S., Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. **The Journal of Neuroscience**, 20, 9104–9110.2000.
- MANDYAM, C.D., NORRIS, R.D. AND EISCH, A.J., Chronic Morphine Induces Premature Mitosis of Proliferating Cells in the Adult Mouse Subgranular Zone, **Journal of Neuroscience Research**, 76, 783-794,2004.
- MANDYAM, C.D., HARBURG, G.C. AND EISCH, A.J., Determination of key aspects of precursor cell proliferation, cell cycle length and kinetics in the adult mouse subgranular zone. **Neuroscience**, 146, 08–122.2007.
- MILLER, M.W., NOWAKOWSKI, R.S., Use of bromodeoxyuridine-immunohistochemistry to examine the proliferation, migration and time of origin of cells in the central nervous system. **Brain Research**, 457,44–52, 1988.
- MING, G.L. AND SONG, H., Adult neurogenesis in the mammalian central

- nervous system. **Annual Review of Neuroscience**, 28, 223–250.2005.
- MONJE, M.L., TODA, H., PALMER, T.D., Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. **Science**, 302,1760–1765.2003.
- MULLEN, R.J., BUCK, C.R., AND SMITH, A.M., NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. **Development**, 116, 201-211.1992.
- PALMER, T.D., Takahashi, J., AND GAGE, F.H., The Adult Rat Hippocampus Contains Primordial Neural Stem Cells. **Molecular and Cellular Neuroscience**, 8, 389–404.1997.
- PALMER, T.D., WILLHOITE, A.R., GAGE, F.H., Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. **The Journal of Comparative Neurology**, 425, 479–494.2000.
- PARENT, J.M., YU, T.W., LEIBOWITZ, R.T., GESCHWIND, D.H., SLOVITER, R.S. AND LOWENSTEIN, D.H., Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. **The Journal of Neuroscience**, 17, 3727-3738.1997.
- PINTO, N.B., MORAIS T.C., CARVALHO, K.M.B., SILVA, C.R., ANDRADE, G.M., BRITO, G.A.C., VERAS, M.L., PESSOA, O.D.L., RAO, V.S., SANTOS, F.A. Topical anti-inflammatory potential of Physalin E from *Physalis angulata* on experimental dermatitis in mice, **Phytomedicine**, 17, 740-743, 2010.
- QU, Q., SUN, G., LI, W., YANG, S., YE, P., Zhao, C., Yu, R.T., GAGE, F.H., EVANS, R.M. and SHI, Y., Orphan nuclear receptor TLX activates Wnt/ β -catenin signalling to stimulate neural stem cell proliferation and self-renewal. **Nature Cell Biology**, 12, 31-41.2010.
- REYNOLDS, B. A. AND WEISS, S., Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. **Science**, 255, 1707–1710.1992.
- RIBEIRO I.M., SILVA, M.T.G., SOARES R.D.A., STUTZ, C.M., BOZZA, M., TOMASSINI, T.C.B. *Physalis angulata* L. antineoplastic activity, *in vitro*,

evaluation from its stems and fruit capsules, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 12, 21-23, 2002.

RODRÍGUEZ, J.J., JONES, V. C., TABUCHI, M., ALLAN, S.M., KNIGHT, E. M., LAFERLA, F.M., ODDO, S., AND VERKHRATSKY, A., Impaired adult neurogenesis in the dentate gyrus of a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. **PloS ONE**, 3, e2935.2008.

SERI, B., GARCÍA-VERDUGO, J.M., COLLADO-MORENTE, L., MCEWEN, B. S., AND ALVAREZ-BUYLLA, A., Cell Types, Lineage, and Architecture of the Germinal Zone in the Adult Dentate Gyrus. **The journal of Comparative Neurology**, 478, 359–378. 2004.

SIDMAN, R. L., MIALE, I. L. & FEDER, N. Cell proliferation and migration in the primitive ependymal zone; an autoradiographic study of histogenesis in the nervous system. **Experimental Neurology**, 1, 322–333.1959.

SILVA, K.N., AGRA M.F., Estudo comparativo entre *Nicandra physalodes* e *Physalis angulata* (Solanaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia** 15, 344-351.2005.

SHELINE, Y.I., WANG, P.W., GADO, M.H., CSERNANSKY J.G., VANNIER M.W., Hippocampal atrophy in recurrent major depression. **Proc Natl Acad Sci USA**, 93, 3908-3913.1996.

SQUIRE, L. R. Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. **Psychol. Rev.** 99, 195–231.1992.

SMART, I., The subependymal layer of the mouse brain and its cell production as shown by autoradiography after [H³]-thymidine injection. **J. Comp. Neurol.**, 116, 325–47,1961.

SOARES, M.B.P., 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 *Physalis angulata* L. **European Journal of Pharmacology**, 459, 107–112.2003.

SONG, H., STEVENS, C.F., AND GAGE, F.H., Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. **Nature**, 417, 39–44.2002.

- SOTELO, C., Viewing the brain through the master hand of Ramón y Cajal. **Nature Reviews Neuroscience**, 4, 71–77.2003.
- SUH, H., CONSIGLIO, A., RAY, J., SAWAI, T., D'AMOUR, K.A., GAGE, F.H., In vivo fate analysis reveals the multipotent and self-renewal capacities of Sox2+ neural stem cells in the adult hippocampus, **Cell Stem Cell**, 1, 515-528.2007.
- TAUPIN, P., Neurogenesis in the adult central nervous system. **Neurosciences**, 329, 465-475.2006.
- TAUPIN, P., BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: Paradigms, pitfalls, limitations, and validation. **Brain research reviews**, 53, 198-214.2007.
- TEMPLE, S., ALVAREZ-BUYLLA, A., Stem cells in the adult mammalian central nervous system. **Current Opinion Neurobiology**, 9, 135–141.1999.
- VIEIRA, A.T., PINHO, V., LEPSCH, L.B., SCAVONE, C., RIBEIRO, I.M., TOMASSINI, T., RIBEIRO-DOS-SANTOS, R., SOARES, M.B.P., TEIXEIRA M.M., SOUZA, D.G., Mechanisms of the anti-inflammatory effects of the natural secosteroids physalins in a model of intestinal ischaemia and reperfusion injury, **British Journal of Pharmacology** 146, 244–251, 2005.
- WALTER, C., MURPHY, B.L., PUN, R.Y., SPIELES-ENGEMANN, A.L., AND DANZER, S.C., Pilocarpine-induced seizures cause selective time-dependent changes to adult-generated hippocampal dentate granule cells. **The Journal of Neuroscience**, 27, 7541–7552. 2007.
- WEXLER, E.M., PAUCER, A., KORNBLUM, H.I., PLAMER, T.D., GESCHWIND, D.H., Endogenous Wnt signaling maintains neural progenitor cell potency. **Stem Cells**, 27, 1130-1141.2009.
- YABE, T., HIRAHARA, H., HARADA, N., ITO, N., NAGAI, T., SANAGI, T., AND YAMADA, H., FERULIC ACID INDUCES NEURAL PROGENITOR CELL PROLIFERATION *IN VITRO* AND *IN VIVO*, **Neuroscience**, 165, 515–524, 2010.

- YOO, K.Y., PARKA, O.K., HWANG, I.K., LI, H., RYU,S.Y., KANG, I.J. YI, J.S., BAE, Y.S., PARK, J., KIM,Y.S., WON, M.H., Induction of cell proliferation and neuroblasts in the subgranular zone of the dentate gyrus by aqueous extract from *Platycodon grandiflorum* in middle-aged mice, **Neuroscience Letters**, 444 97–101, 2008.
- YOO, D.Y., NAM, Y., KIM, W., YOO, K.Y., PARK, J., LEE, C.H., CHOI, J.H., YOON, Y.S., KIM,D.W., HWANG, I.K. Effects of *Ginkgo biloba* Extract on Promotion of Neurogenesis in the Hippocampal Dentate Gyrus in C57BL/6 Mice. **The Journal of Veterinary Medical Science**, 2010.
- YU, Y., SUN, L., MA, L., LI, J., HU, L., LIU, J., Investigation of the immunosuppressive activity of Physalin H on T lymphocytes, **International Immunopharmacology**, 10, 290-297, 2010.
- ZHAO, M., MOMMA, S., DELFANI, K., CARLEN, M., CASSIDY, R.M., JOHANSSON, C.B., BRISMAR, H., SHUPLIAKOV, O., FRISEN, J., JANSON, A.M., Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S. A.** 100, 7925–7930,2003.
- ZHAO, C., DENG, W., GAGE, F.H., Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. **Cell**, 132, 645–60, 2008.
- ZHUANG, P.W., CUI, G.Z., ZHANG, Y.J., ZHANG, M.X., GUO, H., Zhang, J.B., LU, Z.Q., ISAIAH, A.O., & LIN,Y.X., Baicalin Regulates Neuronal Fate Decision in Neural Stem/Progenitor Cells and Stimulates Hippocampal Neurogenesis in Adult Rats, **CNS Neuroscience & Therapeutics**, 19, 154–162, 2013.