

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO *Physalis peruviana* L. EM CÉLULAS HUMANAS NEOPLÁSICAS DE PULMÃO – H460 E CÉLULAS DE RIM EMBRIONÁRIO HUMANO – HEK293

Gabriela Novacki¹, Paulo Roberto Worfel² e Michelli Aparecida Bertolazo da Silva³

Resumo

A cada dia observamos mais estudos comprovando como os extratos de *Physalis peruviana* apresentam papel importante através de diversas atividades biológicas, incluindo propriedade antioxidantes, antimicrobianas, anticancerígenas e antiinflamatórias. Seus compostos indicam um nível de oxidação biogenética que ocorre devido à presença de metabólitos como derivados de ergostano, polioxigenados e vitaesteróides, que faz desse gênero o mais evoluído da família *Solanaceae*. Devido à presença de compostos com atividade antitumoral, as chamadas fisalinas, existem motivos de especulações e pesquisas envolvendo testes de citotoxicidade e viabilidade celular frente a extratos da planta. O presente estudo teve como objetivo analisar os efeitos de extrato aquoso de *Physalis peruviana* L. na viabilidade de células da linhagem HEK 293, de rim embrionário humano, e células humanas de câncer de pulmão não pequenas, H460, ambas crescidas em meio DMEM com suplementação com 10% de soro fetal bovino. O tratamento foi realizado com diferentes concentrações de *P. peruviana* (10; 2; 1; 0,1; 0,01; 0,001mg/ml) analisando os resultados a partir da viabilidade mitocondrial por meio de liberação de azul de Formazan após 24 horas de tratamento. Observaram-se que nas células da linhagem celular H460 obteve-se diferença significativa na viabilidade celular ($p < 0,05$) no período de cultura em comparação ao controle. Em relação a linhagem HEK293 não houve diferença significativa na viabilidade celular ($p > 0,05$) quando comparada ao controle. Sendo assim, os resultados experimentais demonstraram um possível efeito protetor para as células não neoplásicas, apresentando-se como uma fonte promissora para pesquisas de interesse em saúde.

Palavras-chave: Viabilidade celular. Citotoxicidade. Extrato, *Physalis peruviana*. Linhagem celular.

Abstract

Each day we observe that more studies have been proving how *Physalis peruvian* extracts play an important role through several biological activities such as including antioxidant, antimicrobial, anticancer and anti-inflammatory properties. Its compounds indicate a biogenetic oxidation level that occurs due to the metabolites presence such as ergostane derivatives, polyoxigenates and vita steroids, which makes this genus the most evolved of the *Solanaceae* family. Due to the presence of compounds with antitumor activity, so-called fisalinas, there are grounds for speculation and research involving tests of cytotoxicity and cell viability against plant extracts. The present study intends to analyze the effects of *Physalis peruviana* L. aqueous extract on the viability of human embryonic kidney HEK 293 cells and human non-small cell lung cancer cells, H460, both grown in DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum. The treatment was carried out with different concentrations of *P. peruviana* (10; 2; 1; 0.1; 0.01; 0.001mg / ml) analyzing the results from the mitochondrial viability by means of the release of Formazan blue after 24 hours of treatment. It was observed that in H460 there was a significant difference in cell viability ($p < 0.05$) in the culture period in comparison to the control. In relation to the HEK293 there was no significant difference in cell viability ($p > 0.05$) when compared to the control. The experimental results demonstrated a possible protective effect for non-neoplastic cells, presenting as a promising source for research of interest in health.

Keywords: Cell viability. Cytotoxicity. Extract. *Physalis peruvian*. Cellkind.

1 Acadêmica do Curso de Bacharelado em Biomedicina, Universidade Tuiuti do Paraná (Curitiba, PR).

2 Educador Físico, Prof. Mestre da Universidade Tuiuti do Paraná (Curitiba, PR).

3 Farmacêutica, Prof. Mestre da Universidade Tuiuti do Paraná (Curitiba, PR).

1 Introdução

Fruta exótica da família *Solanaceae*, a *Physalis peruviana* L. é uma das principais frutas promissoras na América Central e Sul, com características herbáceas e hábitos perenes ou anuais, variando de acordo com as condições de localidade e crescimento (REYES, MESA, 2007; PEÑA *et al.*, 2010; VERHOEVEN *et al.*, 2010; HERRERA *et al.*, 2011; ROP *et al.*, 2012). O fruto é protegido por um “capacho”, nome dado ao cálice difundido que auxilia em seu transporte e permite a sua comercialização como frutas frescas. Podendo ser incluso em sucos, geleia, sorvete, chocolate, produtos desidratados, entre outros (FISCHER *et al.*, 2006; GUERRERO *et al.*, 2007; GODOY, 2011 PUENTE *et al.*, 2011).

Devido às suas excelentes propriedades nutricionais, a *Physalis peruviana* L. é mundialmente conhecida. Seu fruto tem sabor açucarado e apresenta altos níveis de vitamina A e C, fósforo, ferro, alcaloides, fitoesteróides e flavonoides (RAMADAN, 2011; VALENTE *et al.*, 2011).

Considerando seu nível de oxidação biogenética que ocorre devido a presença de metabólitos polioxigenados, vitaesteróides e derivados de ergostano que fazem com que o gênero *Physalis* seja o mais evoluído da família *Solanaceae*, sendo devido ao vitaesteróide a apresentação de amplas atividades biológicas, antitumoral, antiinflamatória, tripanossomicida e imunomoduladora com potencial medicinal, farmacológico e inseticida, além de apresentar efeitos benéficos em várias doenças crônicas (TOMASSINI *et al.*, 1999; RIBEIRO *et al.*, 2002; LAN *et al.*, 2009; RAMADAN, 2010; HERRERA *et al.*, 2011; RODRIGUES, 2011; ROP *et al.*, 2012; LICODIEDOFF, KOSLOWSKI, RIBANI, 2013; BORDA, HOYOS-CARVAJAL, AGUIRRE-RÁQUIRA, 2014; SAHEBKAR *et al.*, 2018).

Devido à presença de atividade antitumoral das fisalinas, existem motivos de especulações e pesquisas, devido a sua apresentação citotóxica para células. Na literatura apresenta-se relatos de que as fisalinas interferem nas respostas antitumorais, principalmente em linhas celulares de hepatoma humano e extratos de *Physalis* também são relatadas por seus efeitos anticancerígenos (RIBEIRO *et al.*, 2002; RODRIGUES, 2011; WU, 2004).

No entanto, existem diferentes espécies e gêneros de *Physalis*, e cada uma apresenta compostos secundários e resultados diferentes (LICODIEDOFF, KOSLOWSKI, RIBANI, 2013). Sendo assim, esse trabalho teve como objetivo analisar os efeitos de extrato de *Physalis peruviana* L. na viabilidade de células da linhagem HEK 293, de rim embrionário humano, e H460, células humanas de câncer de pulmão não pequenas.

2 Material e Métodos

2.1 Linhagem celular

Em todos os experimentos foram utilizadas células da linhagem de rim embrionário humano - HEK 293 e carcinoma de pulmão - CP H460.

2.2 Soluções

Tripsina: solução (2,500g/L) de tripsina (Cultilab LTDA.) em PBSA contendo EDTA (250mg/L).

Meio de Cultura: Dulbeccos Modified Eagle Medium – DMEM (Cultilab LTDA.) suplementado com 10% v/v de Soro Fetal Bovino (Cultilab LTDA.).

2.3 Cultivo

As células foram mantidas em frascos T (KASVI LTDA.) de 25mL ou placas tratadas de fundo chato individual (KASVI LTDA.) de 96 poços, próprias para cultivo de células aderentes, incubadas em atmosfera úmida a 37°C e 5% CO₂ e 95% ar. O meio de cultura foi trocado a cada um dia. As garrafas foram analisadas em microscópio óptico de luz invertida, para avaliar o aspecto do meio de cultivo e das células em cultivo, bem como sua taxa de crescimento e confluência. Ao atingirem confluência maior ou igual a 85%, era adicionado até 500 microlitros de solução de tripsina – EDTA (0,25%) às garrafas, onde eram incubadas por até 5 minutos e agitadas periodicamente para contribuir com o desprendimento celular. Em seguida, inativação da mesma foi bloqueada com meio DMEM de cultivo suplementado com Soro Fetal Bovino (10%) (SFB).

2.4 Ensaio de Viabilidade Celular

2.4.1 Plaqueamento

As células foram mantidas e tripsinizadas conforme descrito nos itens anteriores. Após a ressuspensão das células em meio DMEM suplementada com 10% Soro Fetal Bovino (SFB). Conforme o experimento, as células foram então subcultivadas em placas de 96 poços. Semeadas na densidade de 3×10^4 células/poço, em um volume final de 200µL/poço. Após serem semeadas, as células eram mantidas nas condições padrão de cultivo até que aderissem ao fundo do poço.

2.4.2 Preparo do Extrato Aquoso

Os frutos de *P. peruviana* foram liofilizados (ilShin Lab Co., Ltd.) durante 5 dias e triturados em graal até se obter o pó. A este pó adicionou-se água destilada 1:10 (peso/volume) e se manteve essa mistura em infusão durante 60 minutos a 60°C. O extrato aquoso obtido foi seco em estufa de circulação (Nova Ética) a 60°C e conservado em geladeira até o momento do uso.

2.4.3 Tratamento

Uma vez que as células estavam aderidas, desprezava-se o conteúdo de cada poço e eram adicionados 200µL de diferentes concentrações de *P. peruviana* (10; 2; 1; 0,1; 0,01; 0,001mg/ml) solubilizadas em meio de cultura em quadruplicatas e comparadas ao controle, após 24 horas de tratamento.

2.4.4 Avaliação da Viabilidade Celular:

A avaliação da viabilidade celular foi realizada a partir do método de redução do brometo 3 - [4,5-dimetil-tiazol - 2-il] - 2,5 - difenil-tetrazlio (MTT).

O ensaio baseia-se na redução de um sal tetrazlico pela desidrogenase mitocondrial das células que estão viáveis para formar o produto, chamado de azul de Formazan. A respiração celular medida no ensaio é proporcional a quantidade produzida de Formazan e o número de células viáveis cultivadas.

2.7 Análise Estatística

As análises estatísticas foram efetuadas usando o teste ANOVA para analisar a diferença entre as concentrações. O programa utilizado para os cálculos estatísticos foi o *GraphPad Prism 8* para *Windows* (Versão 8.0.0 224).

3 Resultados e Discussão

Os resultados do teste azul de Formazan, em que foi analisada a viabilidade mitocondrial das células por meio de liberação do azul de Formazan pode ser observada nas Figuras 1 e 2.

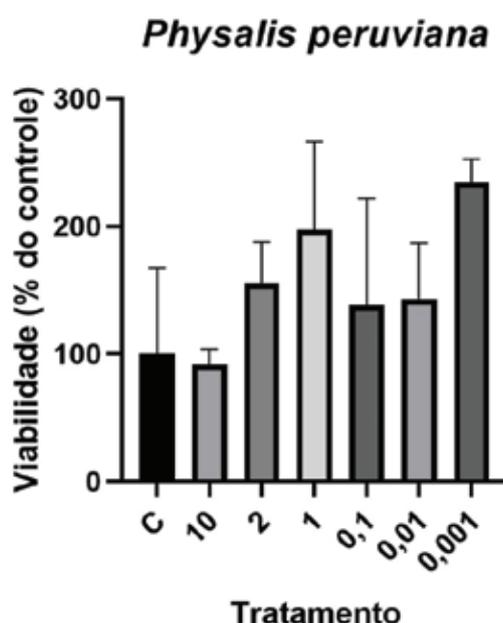


Figura 1: Viabilidade celular por azul de Formazan após período de 24 horas de tratamento em cultura de células da linhagem de rim embrionário humano - HEK 293 em contato com meio de extração de *P. peruviana*. nas concentrações 10; 2; 1; 0,1; 0,01 e 0,001 mg/mL.

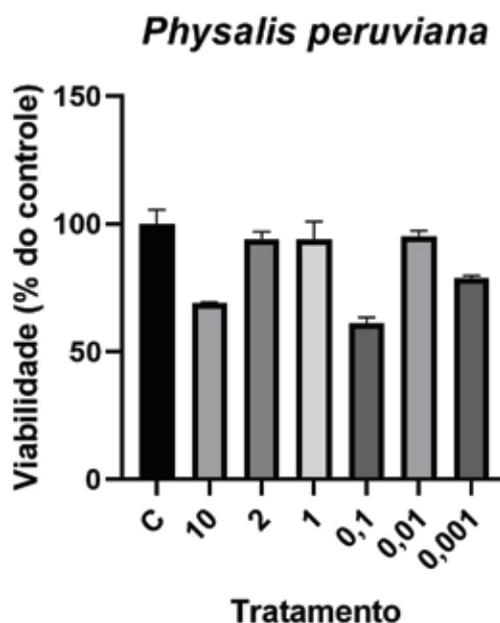


Figura 2: Viabilidade celular por azul de Formazan após período de 24 horas de tratamento em cultura de células da linhagem de carcinoma de pulmão - H460 em contato com meio de extração de *P. peruviana*. nas concentrações 10; 2; 1; 0,1; 0,01 e 0,001 mg/mL.

Os valores obtidos em células da linhagem de carcinoma de pulmão – H460 demonstram diferença significativa ($p < 0,05$) durante o período de cultura em contato com o meio de extração de *P. peruviana* quando comparado com controle negativo (meio DMEM) mostrando que houve indicativo de efeito citotóxico. Na linhagem de rim embrionário humano – HEK 293 não demonstram diferença significativa ($p > 0,05$) durante o período de cultura em contato com o meio de extração de *P. peruviana* quando comparado com controle negativo (meio DMEM) mostrando que não houve indicativo de efeito citotóxico.

Em estudos recentes, extratos etanólicos de frutas frescas e extratos de frutas desidratadas com acetona de frutos de *P. peruviana* indicam possíveis efeitos citoprotetores e antioxidantes em células cerebrais expostas a estímulos neurotóxicos (SAHEBKAR *et al.*, 2018). Segundo VAISBERG *et al.* (2006), a concentração de crescimento inibitório de extratos etanólicos de folhas e caules de *P. peruviana* foram maiores para fibroblastos normais do que células Colo-205 e K562 comparados com 5-fluorouracil, o que significa que a citotoxicidade de *P. peruviana* é mais baixa para células normais em relação ao 5-fluorouracil.

WU *et al.* (2004) descreve que a apoptose induzida pelo extrato etanólico de *P. peruviana* é possivelmente mediada por múltiplas vias, ou seja, diversos compostos em vez de um único podem atuar na indução da apoptose em células de hepatocarcinoma humano – Hep G2. KIM *et al.* (2017) apresenta em seu experimento *in vitro* que *Physalis peruviana* L. reduziu a expressão de mRNA de fator de necrose tumoral- α , a expressão da proteína 1 quimiotática de monócitos e a ativação da

cinase regulada pelo sinal extracelular no pulmão em células epiteliais de adenocarcinoma alveolar humano – A549 estimuladas por fumaça de cigarro.

O estudo de MIER-GIRALDO *et al.* (2017) relatou importante papel a nível celular de *Physalis peruviana* nas linhagens celulares de cânceres L929 e HeLa, como o bloqueio da liberação de citocinas pró-inflamatórias de maneira dose dependente e a inibição celular.

SAHEBKAR *et al.* (2018) demonstra em seu estudo que em polaridade média-alta do solvente em extratos de *P. peruviana* exercem efeito protetor sobre as mitocôndrias. ALVES *et al.* (2005) concluiu que através da avaliação in vivo das physalinas B e D isoladas das partes aéreas de *Physalis angulata* apresentam atividade antitumoral, comprovada utilizando ratos portadores de células tumorais de sarcoma 180 que afetaram os rins e o fígado, porém com efeitos tóxicos reversíveis.

De acordo com estudos de KIM *et al.* (2017) a *Physalis peruviana* L. tem um potencial terapêutico em doenças inflamatórias pulmonares, como por exemplo a doença pulmonar obstrutiva crônica, reduzindo significativamente o efeito de células inflamatórias no lavado broncoalveolar e de pulmão de camundongos com indução de fumaça de cigarro e lipopolissacarídeo. ALVES *et al.* (2005) relata em seu estudo que a identificação dos compostos de extratos etanolicos de *Physalis angulata* explicaria o uso etnofarmacológico desta planta no tratamento do câncer.

É claro que a *Physalis peruviana* tem um grande potencial biológico, MIER-GIRALDO *et al.* (2017) relata que seus resultados também indicam um possível efeito antineoplásico e imunomodulador de interesse para novos produtos farmacêuticos complementares derivados desta fruta exótica

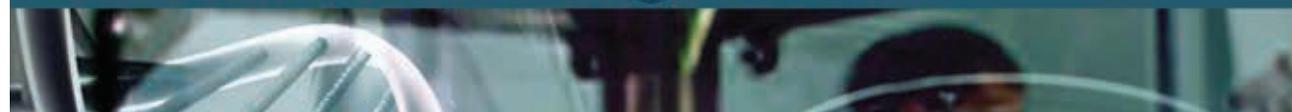
Entretanto, em nosso estudo, a abordagem experimental nos permitiu analisar que o extrato aquoso a quente de *P. peruviana* em células embrionárias normais de rim, parecem apresentar um efeito protetor. WU *et al.* (2004) ainda conclui que o mecanismo molecular detalhado para o efeito anticancerígeno de *P. peruviana* e o isolamento de seus compostos ativos ainda precisam ser mais investigados.

Considerações Finais

Através da análise da viabilidade celular por azul de Formazan, pode-se concluir que a *P. peruviana* apresenta um possível efeito protetor na viabilidade celular na linhagem HEK 293 de rim embrionário humano e apresenta efeito citotóxico comparado ao controle em células humanas de câncer de pulmão não pequenas – H460, porém é necessário realizar novas análises para confirmação desses efeitos.

Referências

ALVES, A. P. N. N.; PESSOA, C.; SILVEIRA, E. R.; MAGALHÃES, H. I. F.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O. D.; TORRES, M. R.; VERAS, M. L.; PESSOA, O. D. L. In-vitro and in-vivo antitumour activity of physalins B and D from *Physalis angulata*. *Jornal of Pharmacy and Pharmacology*, Vol. 58, Pg, 235–241, Out, 2005.



BORDA, D.; HOYOS-CARVAJAL, L.; AGUIRRE-RÁQUIRA, W. Potyvirus Affecting Uchuva (*Physalis peruviana* L.) in Centro Agropecuario Marengo, Colombia. *Agricultural Sciences*, vol. 5, pg. 897-905, Ago, 2014.

FISCHER, G., MIRANDA, D., PIEDRAHITA, W., ROMERO, J., (Eds.) Avances en Cultivo, Poscosecha y Exportación de la Uchuva (*Physalis peruviana* L.). *Unibiblios*, Bogotá D.C. 2006.

GODOY, J.C.M. Simulación Matemática del Proceso de Deshidratación de la Uchuva (*Physalis peruviana* L.). M.Sc. Thesis, *Universidad Nacional de Colombia*, Bogotá D.C., 2011.

GUERRERO, B., VELANDIA, M., FISCHER, G.; MONTENEGRO, H. Los ácidos carboxílicos y la humedad del suelo influyen en la producción y el rajado del fruto de uchuva (*Physalis peruviana* L.). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, vol.1, Pg. 9-19, 2007.

HERRERA M. A. M.; ORTIZ A. J. D.; FISCHER, G.; CHACÓN, S. M. I. Behavior in Yield and Quality of 54 Cape Gooseberry (*Physalis peruviana* L.) Accessions from North-Eastern Colombia. *Agronomia Colombiana*, Vol. 29, Pg. 189-196, Jun, 2011.

KIM, D.; LEE, G.; PARK, H. A.; RYU, H. W.; PARYANTO, I.; LEE, J.; PAIK, J.; KIM, J. H.; AHN, K.; KWON, O.; YUNIATO, P.; CHOI, S.; OH, S.; LEE, S. J.; LIM, Y. *Physalis peruviana* L. inhibits airway inflammation induced by cigarette smoke and lipopolysaccharide through inhibition of extracellular signal-regulated kinase and induction of heme oxygenase-1. *International Journal Of Molecular Medicine*. Vol. 40, Pg. 1557-1565, Set, 2017.

LAN, Y.-H.; CHANG, F.-R.; PAN, M.-J.; WU, C.-C.; WU, S.-J.; CHEN, S. L.; WANG, S. S.; WU, M. J.; WU, Y. C. New Cytotoxic Withanolides from *Physalis peruviana*. *Food Chemistry*, vol. 116, pg. 462-469, Set, 2009.

LICODIEDOFF, S.; KOSLOWSKI, L. A. D.; RIBANI, R.H. Flavonols and Antioxidant Activity of *Physalis peruviana* L. Fruit at Two Maturity Stages. *Acta, Scientiarum Technology*, Maringá, v. 35, n 2, Pg. 393-399. Abr-Jun, 2013.

MIER-GIRALDO, H.; DÍAZ-BARRERA, L. E.; DELGADO-MURCIA, L. G.; VALERO-VALDIVIESO, M. F.; CÁEZ-RAMÍREZ, G. Cytotoxic and Immunomodulatory Potential Activity of *Physalis peruviana* Fruit Extracts on Cervical Cancer (HeLa) and Fibroblast (L929) Cells. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, Vol. 22(4), Pg. 777-787, Mai, 2017.

PEÑA, J.F., AYALA, J.D., FISCHER, G., CHAVES, B., CARDENAS-HERNANDEZ, J., *et al.* Relaciones semilla-fruto en tres ecotipos de uchuva (*Physalis peruviana* L.). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, Vol. 4, Pg. 43-54, 2010.

PUENTE, L.A.; PINTO-MUÑOZ, C.A.; CASTRO, E.S.; CORTÉS, M. *Physalis peruviana* Linnaeus, the Multiple Properties of a Highly Functional Fruit: A Review. *Food Research International*, Vol. 44, Pg. 1733-1740, 2011.

RAMADAN, M.F. Bioactive Phytochemicals, Nutritional Value, and Functional Properties of Cape Gooseberry (*Physalis peruviana*): An Overview. *Food Research International*, Vol. 44, pg. 1830-1836, Dez, 2010.

REYES, R. T.; MESA, J. C. T. Present and Future of Colombian Fruitgrowing. In: Carlos Rincón Humberto, H., Montaña de Mayolo, P. and Peñaloza Acosta, J., Eds., *Colombian Tropical Fruits for the World: Production, Agroindustry, Marketing and Productive Chain*, Produmedios, Bogotá D.C., Pg. 9-22, 2007.

RIBEIRO, I.M.; M.T.G. SILVA; R.D.A. SOARES; C.M. STUTZ; M. BOZZA; T.C.B. TOMASSINI. *Physalis angulata* L. antineoplastic activity, *in vitro*, evaluation from its stems and fruit capsules. *Rev. Bras. Farmacognosia.*, v. 12, supl., p. 21-23, 2002.

RODRIGUES, F. A. Caracterização Físico-Química e Anatômica de *Physalis peruviana* L. *Universidade Federal de Lavras*, Minas Gerais, Cap. 1, p. 13-24, Out, 2011.

ROP, O.; MLCEK, J.; JURIKOVA, T.; VALSIKOVA, M. Bioactive Content and Antioxidant Capacity of Cape Gooseberry Fruit. *Central European Journal of Biology*, V. 7, Pg. 672-679, Mai, 2012.

SAHEBKAR, A.; BARRERA-BAILON, B.; BARRETO, G. E; ASHRAF, G. M.; ALIEV, G.; ZAMUDIO-



RODRIGUEZ J. A.; ROBLES J.; GIRALDEZ, L.; AREIZA-MAZO, N.; ECHEVERRIA, V. Extracts of *Physalis peruviana* Protect Astrocytic Cells Under Oxidative Stress With Rotenone. *Original Research Article, Front. Chem.*, Vol. 6, Pg. 1-13, Jul, 2018.

SEVERO, J.; LIMA, C. S. M.; COELHO, M. T.; RUFATTO, A. D. R.; ROMBALDI, C. V.; SILVA, J. A. Atividade antioxidante e fitoquímicos em frutos de *Physalis* (*Physalis peruviana*, L.) Durante o amadurecimento e o armazenamento. *R. Bras. Agrociência*, Pelotas, Vol.16, N.1-4, Pg.77-82, jan-dez, 2010.

TOMASSINI, T. C. B.; BARBI, N. S.; RIBEIRO, I. M.; XAVIER, D. C. D. Gênero *physalis* - uma revisão sobre vitaesteróides. *Química Nova*, Rio de Janeiro – RJ. Vol 23, nº 1, Jun. 1999.

VAISBERG, A.; QUISPEA A.; ZAVALA D.; ROJAS J.; POSSO M. Efecto citotóxico de *Physalis peruviana* (capulí) en cáncer de colon y leucemia mieloide crónica. Lima, *An Fac Med Lima*. Vol. 67(4), Pg. 283-289, 2006.

VALENTE, A., ALBUQUERQUE, T.G., SANCHES-SILVA, A.; COSTA, H.S. (2011) Ascorbic Acid Content in Exotic Fruits: A Contribution to Produce Quality Data for Food Composition Databases. *Food Research International*, Vol. 44, Pg. 2237- 2242, 2011.

VERHOEVEN, J.T.J., JANSEN, C.C.C., BOTERMANS, M. AND ROENHORST, J.W. Epidemiological Evidence That Vegetatively Propagated, Solanaceous Plant Species Act as Sources of Potato spindle tuber viroid Inoculum for Tomato. *Plant Pathology*, Vol. 59, Pg. 3-12, 2010.

WU, S. J. *et al.* Antihepatoma activity of *Physalis angulata* and *P. peruviana* extracts and their effects on apoptosis in human Hep G2 cells. *Life Sciences Elmsford*, Vol. 74, N. 16, Pg. 2061-2073, Mar, 2004.