

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DO ALCALÓIDE BOLDINA SOBRE A
PROLIFERAÇÃO DE LINHAGENS DE GLIOMA HUMANO E DE RATO.**

Daniéli Gerhardt

Orientadora: Dra. Christianne G. Salbego

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas -
Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial
à obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

**Porto Alegre
2008**

AGRADECIMENTOS

À professora Christianne, pela orientação e exemplo de ética e dedicação à ciência. Pela confiança e liberdade para desenvolvimento deste trabalho.

À Ana Paula, minha “mãezinha” científica, a quem tive a oportunidade de acompanhar durante toda a Iniciação Científica. Querida amiga, te agradeço por estar presente em todos os momentos, por todo ensinamento e ajuda.

À bolsista Mariana, pela ajuda nos experimentos e principalmente pela amizade.

A todos os colegas, e acima de tudo amigos, do laboratório 37 do Departamento de Bioquímica, pelos momentos compartilhados e todas as trocas de idéias.

À Carol e à Andressa, pela ajuda com as linhagens de glioma.

À professora Amélia pela colaboração no início deste trabalho.

Ao Guido, ao Andrés e à Alessandra pela ajuda em experimentos.

Ao departamento de Bioquímica, aos professores e funcionários que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

À CAPES pela bolsa de Mestrado.

À minha família e ao Alex, por estarem sempre presentes. Pelo apoio e incentivo na busca de novos desafios.

RESUMO

Os gliomas malignos, tumores que normalmente originam-se de células da linhagem astrocítica, são os mais comuns e devastadores tumores primários do sistema nervoso central. O Glioblastoma multiforme (GBM) é a classe mais freqüente e uma das formas mais agressivas de câncer. Como consequência, a sobrevivência após o diagnóstico é geralmente de menos de um ano. Desta maneira, novas estratégias terapêuticas se fazem necessárias. Durante as últimas décadas, estudos sobre compostos naturais têm tido sucesso no que diz respeito à pesquisa de agentes anti-câncer, sendo que os alcalóides aporfinóides representam uma categoria com grande potencial. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da boldina, um alcalóide aporfinóide do *Peumus boldus*, em linhagens de glioma, e investigar os possíveis mecanismos de ação envolvidos com este efeito. A boldina foi capaz de diminuir o percentual de células das linhagens U138-MG, U87-MG e C6. Neste estudo, observamos células necróticas após tratamento na linhagem C6. O mesmo efeito não foi observado para baixas concentrações do tratamento nas linhagens U138-MG e U87-MG. A exposição à boldina por 24 h não causou ativação das caspases 3 e 9, executoras-chave da apoptose, ou clivagem do substrato PARP. De acordo com a análise do ciclo celular, boldina induziu parada na fase G₂/M. O índice mitótico também demonstrou redução no número de mitoses. O tratamento com boldina não causou dano no DNA das células U138-MG e não afetou células normais (fatias organotípicas de hipocampo de ratos) com a mesma extensão que afetou as células tumorais. De acordo com estes resultados, sugerimos que a boldina pode ser um novo composto para o desenvolvimento de estratégias anticâncer.

ABSTRACT

Malignant gliomas, tumors that usually arise from cells of astrocytic lineage, are the most common and devastating primary tumors of the central nervous system. Glioblastoma multiforme (GBM) is the most frequent class and one of the most aggressive forms of cancer. As a consequence, survival after diagnosis is normally just less than 1 year. In this manner, new therapeutic strategies are urgently needed. During the last decades, works on natural compounds have been particularly successful in the field of anticancer drug research, and the aporphines alkaloids represent an interesting, potentially useful category of these agents. Thus, the aim of this study was to evaluate the effect of boldine, an aporphine alkaloid of *Peumus boldus*, in glioma cell lines, and investigate the possible mechanisms involved in this effect. Boldine was capable to decrease the percentage of cells in U138-MG, U87-MG and C6 glioma lineages. In this study we observed necrotic cells in C6 lineage after treatment. The same effect was not seen in low concentrations of treatment in U138-MG and U87-MG lineages. The exposure to boldine for 24 h did not result in increase of the activation of caspase-3 and caspase-9, key executioners in apoptosis. No increase in cleavage of the downstream substrate PARP was observed. According to cell cycle analysis, boldine appeared to induce G₂/M arrest in U138-MG cells. Mitotic index also showed a reduction in the percentage of cells in mitosis. The treatment with boldine did not cause DNA damage in U138-MG cells and did not affect normal cells (rat organotypic hippocampal slices) to the extent that it affects tumor cells. According to these results, we suggest that boldine could be a new compound to the development of anticancer therapies.

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação é constituída por Introdução, Artigo científico a ser submetido para publicação, Discussão, Conclusões, Referências Bibliográficas e Anexo.

A **Introdução** apresenta um embasamento teórico do trabalho. Os Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas encontram-se na seção **Capítulo - Artigo Científico**.

As seções **Discussão** e **Conclusão** contêm uma interpretação geral, bem como as principais conclusões da dissertação.

Em **Referências Bibliográficas** há uma listagem das referências utilizadas na Introdução e Discussão desta dissertação.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

- Figura 1.** Representação das principais alterações genéticas identificadas em gliomas humanos 06
- Figura 2.** Imagem representativa das folhas de *Peumus boldus* Molina e da estrutura química do alcalóide boldina 12

CAPÍTULO - ARTIGO CIENTÍFICO

- Figura 1.** Boldine reduces the percentage of U138-MG cells after treatment ... 40
- Figura 2.** Boldine effect on C6 and U87-MG cells 41
- Figura 3.** Effects of boldine on cell death in U138-MG, U87-MG and C6 cells ... 42
- Figura 4.** Effect of boldine on the cell cycle distribution of U138-MG glioma cell line 43
- Figura 5.** Mitotic index of U138-MG cells after 72 h of treatment with the indicated concentrations 44
- Figura 6.** Effect of boldine on activation of caspases 3 and 9 and PARP cleavage 45
- Figura 7.** Effect of boldine on DNA strand breaks 46

Figura 8. Effect of boldine on cell death in organotypic hippocampal slice
cultures 47

LISTA DE ABREVIATURAS

- AKT** - proteína cinase B
- BHE** - barreira hemato-encefálica
- CDK** - ciclina dependente de cinase
- CT** - tomografia computadorizada
- EGFR** - receptor de fator de crescimento epidermal
- FBS** - soro fetal bovino
- FGF2** - fator de crescimento de fibroblasto 2
- GBM** - glioblastoma multiforme
- MAPK** - proteína cinase ativada por mitógeno
- MR** - ressonância magnética
- MRI** - imagem por ressonância magnética
- PARP** - poli ADP ribose polimerase
- PDGF** - fator de crescimento derivado de plaquetas
- PI** - iodeto de propídeo
- PI3K** - fosfatidilinositol 3-cinase
- PKC** - proteína cinase C
- PTEN** - homólogo da fosfatase e tensina deletado no cromossomo 10
- ROS** - espécies reativas de oxigênio
- SNC** - sistema nervoso central
- TMZ** - temozolamida
- VEGF** - fator de crescimento de endotélio vascular

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Câncer	01
1.2. Gliomas	02
1.2.1. Aspectos Gerais	02
1.2.2. Classificação	03
1.2.3. Alterações genéticas	04
1.2.4. Diagnóstico	06
1.2.5. Terapêutica	07
1.2.6. Glioblastoma multiforme	09
1.3. Alcalóides	10
1.3.1. Boldina	11
2. OBJETIVOS	16
3. CAPÍTULO - ARTIGO CIENTÍFICO	17
4. DISCUSSÃO	48
5. CONCLUSÕES	55
6. PERSPECTIVAS	56
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer

O câncer é uma doença considerada um processo de múltiplos passos, que refletem alterações genéticas que levam à transformação progressiva de células normais em derivados altamente malignos (Hanahan & Weinberg, 2000). O seu desenvolvimento começa com a iniciação, fase em que ocorre a primeira alteração genética que é seguida pela progressão, fase em que mutações adicionais aumentam a seletividade das células anormais (Copper, 2001). Tais mutações costumam ocorrer em genes ditos proto-oncogenes produzindo os oncogenes, levando a um ganho de função, ou em genes supressores de tumor e genes de resposta e reparo a danos no DNA, levando a perda de função (Abeloff *et al*, 2004). Estas alterações acarretam na perda do controle que regula a proliferação e homeostasia da célula, levando em última instância, à proliferação descontrolada das mesmas. Segundo Hanahan & Weinberg (2000), são seis as principais alterações na fisiologia celular que ditam este crescimento maligno: auto-suficiência em sinais de crescimento, insensibilidade a sinais de inibição de crescimento, resistência à apoptose, potencial replicativo ilimitado, angiogênese sustentada e capacidade de formação de metástases.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 11 milhões de pessoas são diagnosticadas com câncer a cada ano, e destas, 7 milhões acabam indo a óbito, correspondendo a 12,5% de todas as mortes do mundo (INCA, 2007). Esses números colocam o câncer na terceira posição das maiores causas de morte do mundo.

1.2. Gliomas

1.2.1. Aspectos Gerais

Durante os anos de 1988 a 2002, o número de ocorrência anual para novos tumores primários no sistema nervoso central (SNC) foi de 14,4 para cada 100.000 pessoas nos Estados Unidos (CBTRUS, 2005). Esses valores têm aumentado ao longo dos anos, podendo variar de acordo com idade, raça, sexo, etnia e geografia (Fisher *et al*, 2007), sendo que muito deste aumento pode ser atribuído à evolução e melhoria da capacidade de diagnóstico destes tumores (Wrensh *et al*, 2002). Em crianças de até 14 anos os tumores primários do SNC chegam a corresponder a 23% de todos os cânceres e 26% de todas as mortes devido ao câncer (Abeloff *et al*, 2004). Os fatores de risco mais estabelecidos para estes tumores são radiação ionizante, mutações gênicas e história familiar (Fisher *et al*, 2007).

Os gliomas são os tumores primários mais freqüentes que acometem o SNC. São derivados de células da glia e incluem tumores constituídos predominantemente de células com características de astrócitos (astrocitomas), oligodendrócitos (oligodendrogliomas), astrócitos e oligodendrócitos (oligoastrocitomas) e células ependimais (ependimomas). Dentre estes, os astrocitomas são os mais prevalentes, correspondendo a mais de 60 % dos tumores primários. Os tipos mais comuns são astrocitoma pilocítico, classificado como grau I de acordo com a OMS, astrocitoma difuso (grau II), astrocitoma anaplástico (grau III) e glioblastoma multiforme (grau IV) (Kleihues & Cavenee, 2000).

A origem destes tumores ainda é controversa, apesar de estudos demonstrarem que os tumores cerebrais podem se iniciar a partir de células com

propriedades de célula tronco. Se são derivados de células tronco ou de células que entram em processo de desdiferenciação, ainda não é sabido. Mais estudos são necessários para confirmação de sua origem (Signh *et al*, 2004).

Apesar da alta invasividade local dos gliomas, estes falham em fazer metástases fora do SNC, provavelmente porque não conseguem ultrapassar a barreira hematoencefálica ou por serem deficientes em moléculas de adesão, prevenindo assim a fixação ao tecido em locais potenciais para metástase (Laws & Shaffrey, 1999).

1.2.2. Classificação

A Organização Mundial de Saúde (OMS) fornece uma classificação dos gliomas segundo seu grau de malignidade, baseando-se em critérios histopatológicos como atipias nucleares, atividade mitótica, proliferação microvascular e necrose. Esta classificação compreende 4 graus (Louis *et al*, 2007):

- Grau I - geralmente são lesões benignas com baixo potencial de proliferação e que permitem cura do paciente após ressecção cirúrgica sem necessidade de tratamentos adicionais.
- Grau II - lesões infiltrativas, e mesmo com baixos níveis de atividade proliferativa, geralmente recorrem. Tendem a progredir para níveis maiores de malignidade.
- Grau III - lesões com evidências histológicas de malignidade, incluindo atipias nucleares e atividade mitótica ativa. Tendem a evoluir para grau IV.

- Grau IV - lesões citologicamente malignas, mitoticamente ativas, propensas a necrose. Apresentam rápida evolução pré e pós-operatória levando a resultados fatais.

A graduação do tumor, bem como a idade do paciente, o desempenho neurológico, a localização do tumor, os índices de proliferação e as alterações genéticas são fatores que contribuem para a estimativa do prognóstico. Pacientes que apresentam glioma de grau II podem sobreviver até mais de 5 anos, e de grau III, sobrevivem de 2 a 3 anos. Já a média de sobrevivência para pacientes com glioblastoma (grau IV) fica em torno de 1 ano, com menos de um terço sobrevivendo mais que isso (Louis *et al*, 2007).

1.2.3. Alterações genéticas

A maioria das alterações genéticas identificadas nos gliomas humanos resulta em ativação anormal de sinalizações a partir de receptores tirosina-cinase e/ou a partir da perda do controle do ciclo celular.

Os tumores do SNC desenvolveram a capacidade de expressar seus próprios fatores de crescimento junto a seus respectivos receptores, resultando na possibilidade de estimulação autócrina (Feldkamp *et al*, 1997). Por exemplo, o receptor de fator de crescimento epidermal (EGFR) é super-expresso em 40 a 60 % dos glioblastomas (Tang *et al*, 1997). Fatores de crescimento como fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento de fibroblasto 2 (FGF2) e fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF) também são super-expressos em gliomas (Campbell & Pollack, 1997; Dai & Holland, 2001).

A super-expressão de receptores e ligantes produz um aumento na sinalização, que resulta em ativação de várias vias relacionadas à proliferação. As

principais vias ativadas são a via das MAPKs (Mitogen-activated Protein kinase), envolvendo as proteínas Ras e Raf, e a via da PI3K (Phosphoinositide 3-kinase), que leva à ativação da proteína AKT (Protein kinase B) (Rempel, 2001). Mutações na proteína PTEN (Phosphatase and tensin homologue deleted from chromosome 10) também podem levar à ativação de AKT (Haas-Kogan *et al*, 1998). As sinalizações via receptores tirosina-cinases podem resultar em ativação das vias de C-MYC e da proteína cinase C (PKC) (Abeloff *et al*, 2004).

O outro grande grupo de alterações resulta na perda do controle da progressão do ciclo celular. A mutação mais comum é a que leva à deleção da proteína INK4-ARF que codifica as proteínas p16^{INK4a} e p14^{ARF}. Mutações também podem ocorrer nas duas vias que seguem estas proteínas codificadas: via p16^{INK4a}/cdk4/Rb ou via p14^{ARF}/mdm2/p53 (Dai & Holland, 2001).

A soma de todas essas alterações contribui para a expressão da principal característica dos tumores, a proliferação descontrolada. A figura 1 apresenta as principais alterações genéticas identificadas nos gliomas.

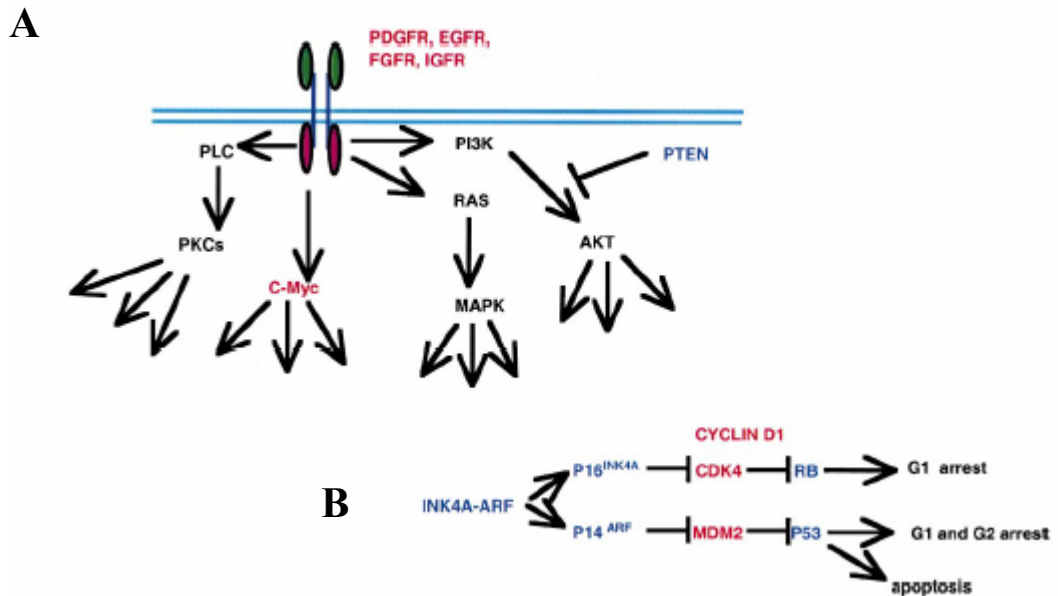


Figura 1: Representação das principais alterações genéticas identificadas em gliomas humanos. As mutações afetam (A) as vias de transdução de sinais ou (B) as vias de controle do ciclo celular. Proteínas codificadas por genes implicados em efeitos oncogênicos com ganho de função estão em vermelho, e as proteínas codificadas por genes implicados em efeitos supressores de tumor com perda de função estão em azul. Adaptado de Dai & Holland (2001).

1.2.4. Diagnóstico

Os primeiros sintomas clínicos de glioma são dores de cabeça, papiloedema, náusea e vômitos, resultado do aumento da pressão intracranial exercida pelo tumor e edema provocado por ele. Ataques epilépticos são mais comuns em pacientes com glioma de baixo grau. Podem apresentar déficit neurológico na forma de perda sensorial ou motora, problemas de memória e

outros aspectos relacionados a funções mentais (Laws e Shaffrey, 1999; Behin *et al*, 2003).

O diagnóstico dos gliomas geralmente é feito por análise de imagem. A tomografia computadorizada (CT) é o primeiro método a ser realizado nos pacientes que apresentam comprometimento neurológico servindo de “screening” inicial. A imagem por ressonância magnética (MRI) tem se tornado o método de escolha para a identificação de tumores cerebrais devido a sua alta capacidade de definição da anatomia cerebral e eliminação de artefatos ósseos. Outro método utilizável é a espectroscopia de ressonância magnética (MR) que serve para distinguir gliomas de alto grau de gliomas de baixo grau ou necrose por radiação. Existe ainda a imagem de tomografia por emissão de pósitron, que utiliza um isótopo radioativo. Este método possibilita a visualização da fisiologia cerebral, mostrando importância no diagnóstico de glioblastoma (Abeloff *et al*, 2004). No entanto, os padrões de imagem não são específicos, sendo necessária a avaliação histológica de amostras de biópsias ou cirurgia para confirmação do diagnóstico do tumor. Este diagnóstico patológico depende da comparação de similaridades de células tumorais com células gliais maduras não neoplásicas (Kleihues & Cavenee, 2000).

1.2.5. Terapêutica

Os astrocitomas malignos são incuráveis e o objetivo principal dos tratamentos é melhorar os déficits neurológicos (incluindo funções cognitivas) e aumentar a taxa de sobrevivência do paciente, mantendo a melhor qualidade de vida possível (Behin *et al*, 2003).

A terapia inicial compreende a cirurgia para extração do tumor. O sucesso da mesma requer a retirada do tumor sem afetar as regiões normais do cérebro que estão ao redor, visando a possibilidade de avaliação histológica da lesão, melhora do déficit neurológico e prevenção da morte precoce do paciente (Abeloff *et al*, 2004). Como a cirurgia raramente consegue remover completamente o tumor devido a sua grande capacidade de infiltração, a maioria dos pacientes são tratados com as terapias adjuvantes (radioterapia pós-operatória e quimioterapia) (Laws e Shaffrey, 1999). A graduação do tumor é um dos fatores que influenciam na escolha destas terapias.

A radioterapia procura atingir as células malignas que podem ter migrado pelo cérebro durante o processo invasivo, melhorando assim o tempo de vida dos pacientes. Geralmente é administrada em frações de 2 Gy (Gray) para doses totais variando de 58-60 Gy, considerado como limite superior para dose segura. Apesar disso, disfunções cognitivas e necrose costumam ocorrer (Laws e Shaffrey, 1999; Behin *et al*, 2003).

A quimioterapia para tumores cerebrais costuma apresentar os mesmos problemas que a quimioterapia para câncer sistêmico, incluindo falta de especificidade, resistência intrínseca ou desenvolvida das células malignas, toxicidade sistêmica, intolerância do tecido normal a toxicidade da droga (Abeloff *et al*, 2004). Além disso, o SNC é protegido pela barreira hematoencefálica (BHE), que limita o acesso aos quimioterápicos, permitindo apenas a entrada de fármacos que apresentem caráter lipofílico (Mousseau *et al*, 1993). Dentre os quimioterápicos usados como tratamento de escolha e que parecem apresentar melhores resultados, podemos citar as nitrosuréis e a temozolamida (Behin *et al*, 2003).

1.2.6. Glioblastoma multiforme

O glioblastoma multiforme (GBM) é a forma mais agressiva dos astrocitomas, com média de sobrevivência de apenas um ano, mesmo após cirurgia e regimes agressivos de radio e quimioterapia (Maher *et al*, 2001). Devido à baixa sobrevivência dos pacientes, pesquisadores procuraram definir fatores que parecem influenciar no prognóstico destes tumores. Entre eles podemos citar: idade, extensão de ressecção tumoral, capacidade para ressecção completa, grau de necrose, volume de doença residual, tamanho do tumor, condições do paciente após radioterapia entre outros (Jeremic *et al*, 2003; Lutterbach *et al*, 2003).

Estes tumores são sempre infiltrativos, formados por uma massa intraparenquimal heterogênea que evidencia áreas de necrose e hemorragia. O GBM possui muitas variantes histopatológicas, incluindo células gigantes próprias do glioblastoma, pleomorfismo celular e nuclear, proliferação microvascular, regiões de necrose rodeadas por células de arquitetura pseudopaliçada entre outras (Dai & Holland, 2001).

Os GBMs têm sido divididos em 2 subgrupos baseados em aspectos clínicos e biológicos. O glioblastoma primário de origem *de novo*, geralmente encontrado em pacientes idosos como um tumor altamente invasivo e agressivo, usualmente sem evidências de doença prévia. Já o glioblastoma secundário é resultado da progressão de astrocitomas de grau mais baixo (Kleihues & Cavenee, 2000).

1.3. Alcalóides

Os alcalóides são compostos orgânicos nitrogenados, de caráter mais ou menos básico, de origem natural e farmacologicamente ativos (Kutchan, 1995). O termo alcalóide foi introduzido por W. Meisner em 1818 referindo-se as suas propriedades básicas (Bruneton, 1999).

Eles são produzidos pelo metabolismo secundário de plantas representando 20% das substâncias naturais descritas. Além de serem encontrados predominantemente em angiospermas, também podemos citar os microorganismos e animais marinhos como outras fontes de alcalóides (Bruneton, 1999).

A origem destes metabólitos secundários pode ser resumida a partir do metabolismo de glicose, via dois intermediários principais, o ácido chiquímico e o acetato. São sintetizados no retículo endoplasmático, concentrando-se em seguida nos vacúolos, para posterior distribuição pela planta. Podem ser encontrados em todas as partes do vegetal, mas geralmente ocorre o acúmulo preferencial em um ou mais órgãos (Simões, 2003).

Os alcalóides constituem uma classe de metabólitos secundários representada por um número muito grande de substâncias estruturalmente muito diversas e, portanto, difícil de ser definida quimicamente. De uma maneira geral, o átomo de nitrogênio presente nos alcalóides é oriundo de aminoácidos e o anel heterocíclico formado fornece a base para sua classificação química (Bruneton, 1999). Outros precursores como terpenos ou esteróides também podem ser incorporados na construção do esqueleto final de alguns alcalóides (Dewick, 1997).

Dentre a classe dos alcalóides isoquinolínicos, os aporfinóides representam um subgrupo grande e ainda em expansão, com mais de 500 alcalóides isolados de mais de 90 gêneros de plantas (Guinaudeau, 1994) Tais alcalóides apresentam como precursor biogenético o aminoácido L-tirosina (Simões, 2003). Dentre eles, a boldina foi o primeiro aporfinóide a ser isolado das folhas de *Peumus boldus*, há mais de 130 anos por Bourgoin e Verne, provando sua estrutura como (S)-2,9-dihidroxi-1,10-dimetoxi-aporfina (Speisky & Cassels, 1994).

1.3.1. Boldina

A boldina, (S)-2,9-dihidroxi-1,10-dimetoxi-aporfina (figura 2), é o alcalóide majoritário encontrado nas folhas e cascas da árvore de pequeno porte *Peumus boldus* Molina, da família Monimiaceae. A espécie *Peumus boldus* é uma planta originária da região central e sul do Chile (Lanhers *et al*, 1991; Rombi, 1991; Speisky & Cassels, 1994) entre latitude de 33 e 39° (Urzúa & Acuña, 1983), e por isso é conhecida popularmente como Boldo-do-Chile (Simões *et al*, 1998). A concentração de boldina nas folhas de Boldo é estimada em 0,14% (Quezada *et al*, 2004) e pode chegar a mais de 6% nas cascas, baseado no peso seco (Urzúa & Acuña, 1983). Além da família Monimiaceae, a boldina também pode ser encontrada em pequenas quantidades em plantas das famílias Magnoliaceae, Annonaceae, Rhamnaceae e Laureacea (Varanda & Santos, 1998; Speisky & Cassels, 1994).

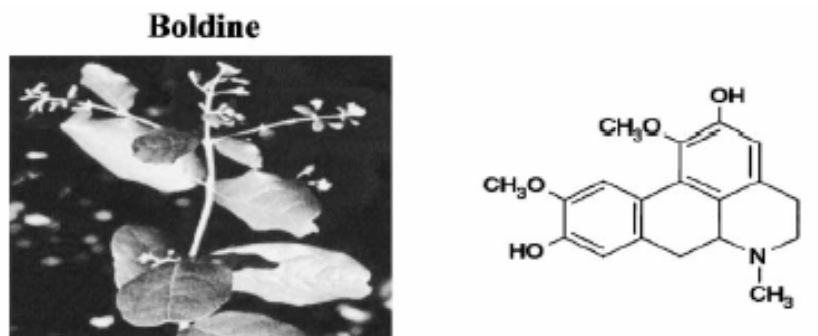


Figura 2: Imagem representativa das folhas de *Peumus boldus* Molina e da estrutura química do alcalóide boldina.

Acreditava-se que a boldina, por meio de preparações de folhas de Boldo, havia sido usada pela primeira vez no Chile, quando a população local descobriu que ovelhas com infecções no fígado, geralmente fatais, sobreviviam quando comiam folhas de Boldo continuamente (Magistretti, 1980).

A origem da utilização é dúbia, mas o fato é que preparações envolvendo as folhas do Boldo vêm sendo largamente utilizadas por grande parte da população. Entre os usos mais relatados podemos citar: colagogo-colerético, diurético, digestivo, hepatoprotetor, analgésico, laxante, cardiotônico, carminativo, hepatotônico, estimulante, vermífugo, para tratamento da dor de cabeça, da dor de ouvido, da congestão nasal, da dor de garganta, do reumatismo, da doença dos nervos, da dispepsia, da dor menstrual, da sífilis e gonorréia e ainda como sedativo e hipnótico (Speisky & Cassels, 1994; Simões *et al*, 1998).

Este alcalóide apresenta baixa toxicidade, mostrado pelas altas doses necessárias para induzir morte em várias espécies de mamíferos (15g de boldina, administradas oralmente, foram necessárias para matar um cachorro de 12 Kg, da

mesma forma, 500 e 1000mg/Kg foram requeridos para matar camundongos e porcos da Índia, respectivamente) (Speisky & Cassels, 1994). Já para administrações intraperitoniais foi encontrado o valor de DL50 de 250mg/Kg para ratos (ESCOP, 1997). A boldina também não induziu aumento significativo na frequência de aberrações cromossômicas ou permutação de cromátides irmãs quando testada em linfócitos sanguíneos periféricos de humanos e em estudo *in vivo* (nas concentrações de 225, 450 e 900mg/Kg) usando células da medula óssea de ratos (Tavares & Takahashi, 1994). Estudos posteriores confirmaram que a boldina, administrada de forma intraperitoneal em doses subletais, não induziu sinais de genotoxicidade na medula óssea de ratos no teste de micronúcleo (Speisky & Cassels, 1994). Também não foram observadas mudanças histológicas com administração prolongada de doses regulares no período de 90 dias em ratos (Almeida *et al*, 2000). Estes dados contribuem para a maior busca e aprofundamento de estudos visando elucidar as atividades biológicas da boldina.

Entre as atividades mais pesquisadas cientificamente, podemos citar seu efeito em distúrbios digestivos, bem como ação hepato-biliar. No que diz respeito a investigações no trato gastrointestinal, o estudo de Delourme (1949) apresentou a boldina como inibidora de contrações peristálticas do intestino de gatos. O mesmo efeito foi demonstrado por Kreitmar (1952) em cachorros e também em coelhos (Rombi, 1991). Na mesma linha de pesquisa, Speisky e colaboradores (1991) apresentaram um efeito relaxante concentração-dependente na musculatura lisa do íleo de ratos *in vitro*. Kreitmar, em 1952, chegou à descoberta de que boldina exercia atividade colerética e colagoga em vários experimentos com animais. Estes efeitos foram confirmados por Delso-Jimeno (1956). Böhm

(1959) e Lévy-Appert-Collin (1977) também observaram atividade colerética para boldina.

Estudos a respeito da atividade antioxidante também são freqüentes. Estes mostram que a boldina comporta-se como um potente antioxidante em sistemas biológicos submetidos a dano peroxidativo por radicais livres, prevenindo a peroxidação de membranas plasmáticas de eritrócitos, bem como a de homogeneizados de cérebro. Além disso, a boldina protege enzimas suscetíveis a inativação por peroxidação. O mecanismo de ação parece estar envolvido com a capacidade da molécula da boldina atuar como captador de radicais hidroxila (Speisky & Cassels, 1994).

O efeito antioxidante evitando a lise de eritrócitos também foi confirmado por Jimenez e colaboradores (2000), os quais destacam propriedade citoprotetora tempo dependente frente ao dano hemolítico induzido quimicamente. Youn e colaboradores (2002) mostraram que boldina pode atenuar a disfunção mitocondrial do cérebro de ratos induzida por catecolaminas e diminuir a morte induzida por dopamina de células PC12 através de uma ação captadora de radicais livres. A boldina também parece atenuar o desenvolvimento de diabetes induzida por streptozotocina em ratos devido a sua capacidade antioxidante (Jang *et al*, 2000).

Existem também outros relatos sobre atividades biológicas da boldina para o tratamento das mais variadas enfermidades. Stévigny e colaboradores (2005), em um amplo estudo de revisão, expuseram vários alcalóides do tipo aporfinóide já relatados em artigos científicos por apresentarem atividades citotóxicas e anti-tumorais, mostrando assim o grande potencial deste tipo de alcalóide no desenvolvimento de agentes anti-câncer. A boldina, entre os demais, foi relatada

por apresentar atividade citotóxica em células de câncer de colo uterino (HeLa) em estudo conduzido por Hoet e colaboradores (2004). No entanto, ainda não existem estudos sobre o seu efeito em células de gliomas.

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL:

- Investigar o efeito do alcalóide aporfinóide boldina em diferentes linhagens de gliomas humanos e de rato.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Testar diferentes concentrações de boldina sobre a proliferação celular da linhagem de glioma U138-MG.
- Verificar se o efeito exercido pela boldina se mantém em outras linhagens (U87-MG e C6).
- Avaliar a potencialidade da boldina em ativar a apoptose nas células tumorais.
- Avaliar a potencialidade da boldina em interferir no ciclo celular das células tumorais.
- Avaliar a citotoxicidade da boldina em células não tumorais do tecido cerebral de ratos.

3. CAPÍTULO - ARTIGO CIENTÍFICO

IDENTIFICATION OF A NOVEL ANTIPROLIFERATIVE AGENT, BOLDINE, AGAINST GLIOMA CELL LINES

Artigo a ser submetido para publicação na revista *Investigational New Drugs: The Journal of New Anticancer Agents*.

**IDENTIFICATION OF A NOVEL ANTIPROLIFERATIVE AGENT, BOLDINE,
AGAINST GLIOMA CELL LINES**

Daniéli Gerhardt¹, Ana Paula Horn¹, Mariana Maier Gaelzer¹, Rudimar Luiz Frozza¹,
Andrés Delgado-Cañedo¹, Alessandra Luiza Pelegrini², Guido Lenz² and Christianne
Salbego^{1,*}

¹ Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS,
Rua Ramiro Barcelos 2600, 90035.003, Porto Alegre, RS, Brazil

² Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, UFRGS,
Avenida Bento Gonçalves, 9500, 91501.970, Porto Alegre, RS, Brazil

* Corresponding Author:

Christianne Salbego (salbego@terra.com.br)

Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS,
Rua Ramiro Barcelos 2600 - Anexo I, 90035.003, Porto Alegre, RS, Brazil

Phone: +55 (51) 3308.5570

FAX: +55 (51) 3308.5535

Abstract

Malignant gliomas are the most common and devastating primary tumors of the central nervous system. The aim of this study was to evaluate the effect of boldine, an aporphine alkaloid of *Peumus boldus*, in glioma cell lines, and investigate the possible mechanisms involved in this effect. Boldine was capable to decrease the percentage of cells in U138-MG, U87-MG and C6 glioma lineages. We observed that cell death caused by boldine was dependent on cell type and boldine concentrations. The exposure to boldine for 24 h did not result in increase of the activation of key executioners in apoptosis. Boldine appeared to induce G₂/M arrest in U138-MG cells according to cell cycle analysis. Boldine did not affect normal cells (rat organotypic hippocampal slices) to the extent that it affects tumor cells. According to these results, we suggest that boldine could be a new compound to the development of anticancer therapies.

Keywords: glioma, proliferation, boldine, antitumor agent

Introduction

Malignant gliomas, tumors that usually arise from cells of astrocytic lineage, are the most common and devastating primary tumors of the central nervous system (CNS) [1]. Glioblastoma multiforme (GBM), or grade IV astrocytoma, is the most frequent class of malignant primary brain tumors and one of the most aggressive forms of cancer. As a consequence, survival after diagnosis is normally just less than 1 year even for patients treated with aggressive surgery, radiotherapy, and common chemotherapy regimens [2, 3].

The excessive proliferation, disseminated tumour growth, extremely rich neovascularization, evasion to immune responses, and resistance towards apoptotic stimuli are the main features of malignant gliomas making their treatment especially complicated [4, 5]. In this manner, new therapeutic strategies are urgently needed.

The use of plants as medicines goes back to early man [6]. During the last decades, investigation with natural compounds have been particularly successful in the field of anticancer drug research [7] and the aporphines alkaloids represent an interesting, potentially useful category of this agents [8]. Boldine, an aporphine alkaloid with structure (S)-2,9-dihydroxy-1,10-dimethoxy-aporphine, occurs abundantly in the leaves and bark of boldo (*Peumus boldus* Molina), a widely distributed native tree of Chile [9].

This alkaloid has attracted attention in relation to its potent antioxidant properties. It has been reported that boldine prevents both enzymatic and non-enzymatic mediated damage to biological systems. *In vitro*, it inhibits the free-radical-mediated initiation and propagation of the peroxidative damage induced in

various membrane types (such as liver homogenates, hepatic microsomes and ghost erythrocytes) and it blocks the free radical-dependent lysis of red blood cells and intact hepatocytes [10, 11, 12]. Boldine has also been described to have anti-inflammatory and hepatoprotective effects, antitrypanosomal (on *Trypanosoma brucei brucei*) and *in vitro* cytotoxic (on HeLa cells) activities [13, 14]. However, the anticancer properties of this compound have not been well characterized. In this report, we demonstrated a selective toxicity of boldine against glioma cells *in vitro*. Detailed analysis showed that its effect can be mediated by cell death and cell growth arrest at G₂/M phase. So, boldine may represent a new compound with anti-glioma potentialities.

Material and Methods

Chemicals

Boldine was obtained from Spectrum® (New Jersey, USA). Propidium iodide (PI) was obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Cell culture media were obtained from Gibco-Invitrogen (Grand Island, NY, USA). All other reagents were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) or Merck (Darmstadt, Germany).

Cell Culture

U138-MG and U87-MG human glioma cell line, and C6 rat glioma cell line were obtained from American Type Culture Collection (Rockville, Maryland, Md., USA). Cells were grown and maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium

(DMEM; Gibco-Invitrogen, Grand Island , NY, USA) supplemented with 5% (C6) or 10% (U138-MG and U87-MG) (v/v) fetal bovine serum (FBS; Gibco-Invitrogen, Grand Island , NY, USA) and containing 2.5 mg/mL Fungizone ® and 100 U/L gentamicin (Schering do Brasil, São Paulo, SP, Brazil) . Cells were kept at a temperature of 37°C, a minimum relative humidity of 95% and an atmosphere of 5% CO₂ in air. All the experiments throughout this study were conducted in serum supplemented DMEM.

Cell Treatment

U138-MG and U87-MG glioma cells were seeded at 3×10^3 or 3×10^5 cells per well in DMEM/10% FBS in 24-well plates or 6-well plates, respectively, and grown for 24 h. The same protocol was used to C6 glioma cells, except that they were seeded in DMEM/5% FBS. Boldine was dissolved in mili-Q water. The cells were treated with boldine for 24 or 72 h with concentrations (μM) 1, 10, 50, 80, 100, 250 or 500. The medium was changed once a day with replacement of the drug. Cells not treated were used as controls.

Cell Counting

At the end of 72 h of treatment, the medium was removed, U138-MG cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and 200 μL of 0,25% trypsin/EDTA solution was added to detach the cells, which were counted immediately in a hemocytometer.

Sulforhodamine Assay

The assay was based on a protein staining method, which provides a quantitative measure of the percentage of cells. After 72 h of treatment, the medium was removed, the cells were washed three times with PBS and 500 μ L PBS/formol 4% was added. After 15 min, fixed cells were stained with sulforhodamine B. Subsequently, the wells were washed with deionized water to remove unbound stain. The culture plates were air dried and protein-bound sulforhodamine was solubilized in 1% SDS. Absorbance was measured by an ELISA plate reader at 515 nm. This absorbance was linearly proportional to the number of cells. The assay was performed as previously described [15] with modifications.

Propidium iodide assay

To identify cellular death, propidium iodide (PI) 5 μ M was added to glioma cell lines 1 h before 72 h of treatment or not with boldine. Propidium iodide fluorescence was excited at 515-560 nm using an inverted microscope (Nikon Eclipse TE300) fitted with a standard rhodamine filter. Images were captured using a digital camera connected to the microscope and analyzed using Adobe Photoshop software [16].

Cell cycle analysis

Analysis of the cell cycle was performed as previously described [17], with slight modification. U138-MG cells were plated in 6-well plates and, after one day grown, they were treated with boldine for 24 h; the cells were washed with PBS and then treated with a solution containing 50 μ g PI, 10 mM Tris, 10 mM NaCl, 0,7

U RNase (Invitrogen Carlsbad, CA, USA) and 0,01% NP-40 (USB, Switzerland). After 30 min, data was collected of width (fl2w) and area (fl2a) of 30,000 fl2 (red-orange) pulses. Results were analyzed using Winmdi and Cylehred software (University of Wales College of Medicine, Cardiff, UK).

Organotypic hippocampal slice cultures

Organotypic hippocampal slice cultures were prepared according to the method of Stoppini [18] with modifications [19, 20]. All animal use procedures were approved by local Animal Care Committee and were in accordance with the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Briefly, 400 μm thick hippocampal slices were prepared from 6-8-day-old male *Wistar* rats using a McIlwain tissue chopper and separated in ice-cold Hank's balanced salt solution (HBSS), pH 7.2. The slices were placed on Millicell culture membranes and the inserts were transferred to a six-well culture plate. Each well contained 1 mL of tissue culture medium consisting of 50% minimum essential medium (MEM), 25% HBSS, 25% heat inactivated horse serum supplemented with (mM, final concentration): glucose 36, HEPES 25 and NaHCO_3 4; fungizone 1% and gentamicin 0,1 mg/mL, pH 7.3. Organotypic cultures were maintained in a humidified incubator gasified with a 5% CO_2 atmosphere at 37°C for 14 days. Culture medium was changed twice a week. After 14 days, cultures were treated or not with 80, 250 or 500 μM of boldine. To identify cellular death, PI 5 μM was added to cultures 1 h before 72 h of treatment. PI fluorescence was excited at 515-560 nm using an inverted microscope (Nikon Eclipse TE300) fitted with a standard rhodamine filter. Images were captured using a digital camera connected to the microscope and analyzed using Adobe Photoshop software [20].

Mitotic index

After 72 h of treatment, U138-MG cells were fixed with ethanol 70%. Following fixation, cells were stained with PI, then analysed by fluorescence microscopy. At least 100 cells were counted for each determination and the result shown is representative of those observed in three experiments. Mitotic cells were judged with chromosome condensation and nuclear membrane destruction [21].

Western blot Assay

After treatment for 24 h with 80 μ M of boldine, cells were homogenized in lyses buffer (4% sodium dodecylsulfate (SDS), 2 mM EDTA, 50 mM Tris). Aliquots were taken for protein determination and β -mercaptoethanol (Sigma Chemical) was added to a final concentration of 5%. Proteins were resolved (50 μ g per lane) on 10 or 12% SDS-PAGE (Sigma Chemical). After electrophoresis, proteins were electro transferred to nitrocellulose membranes (Hybond™ ECL™ nitrocellulose membrane, Amersham Biosciences, Fryeburg, Germany) using a semi-dry transfer apparatus (Bio-Rad, Trans-Blot SD, Hercules, CA, USA). Membranes were incubated for 60 min at 4°C in blocking solution (Tri-buffered saline containing 5% powdered milk and 0.1% Tween-20, pH 7.4) and further incubated with the appropriate primary antibody dissolved in the blocking solution overnight at 4°C. The primary antibodies (purchased from Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) against the following proteins were used: anti-cleaved caspase-3 (Asp175) (1:500), anti-caspase-3 (1:500), anti-cleaved caspase-9 (1:500), anti-caspase-9 (1:500), anti-cleaved PARP (1:500), anti-PARP (1:500), and anti- β -actin (1:1000). The membranes were then incubated with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody (1:1000; Amersham Pharmacia

Biotech, Piscataway, NJ, USA). The chemiluminescence (ECL, Amersham Pharmacia Biotech) was detected using X-ray films (Kodak X-Omat, Rochester, NY, USA). The films were scanned and analyzed using Adobe Photoshop software. The positive control used in this assay was UV-exposed organotypic hippocampal slice cultures.

Comet assay

The alkaline comet assay was performed as previously described, with minor modifications [22, 23]. After treatment, cells were washed, trypsinized and resuspended in PBS. Then, cell suspensions were embedded in 0.75% low-melting point agarose, and immediately spread onto a glass microscope slide pre-coated with a layer of 1% normal melting point agarose. After the lysis procedure, the slides were placed on a horizontal electrophoresis unit. Electrophoresis was conducted for 20 min at 25 V (0.9 V/cm) and 300 mA. Slides were stained using a silver staining protocol. After the staining step, gels were left to dry at room temperature overnight and analyzed using an optical microscope. The positive control used in this assay was methyl methanesulfonate.

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm S.E.M. Analysis of variance (ANOVA) was applied to the means to determine statistical differences between experimental groups. Post hoc comparisons were performed by Tukey's test. Differences between mean values were considered significant when $p < 0.05$.

Results

Cell growth inhibition effect of Boldine in U138-MG glioma cells

Considering that aporphinoid alkaloids have been reported to have cytotoxic and antitumor potencialities [8], we studied the effect of boldine in the proliferation of U138-MG glioma cell line. The cells were treated with increasing concentrations (1 – 500 μ M) of boldine for 72 h. As show in Fig. 1a, the number of U138-MG cells decreased when treated with concentrations of boldine from 80 to 500 μ M. The results obtained using sulphorhodamine B assay were similar to cell counting data (Fig. 1b).

Boldine also inhibits cell growth in malignant glioma cell lines U87-MG and C6

To determine whether boldine has de same effect on cell growth from U87-MG and C6 glioma cell lines, we performed the sulphorhodamine B assay using the concentrations (80, 250 and 500 μ M) which were effective for U138-MG. Significantly growth inhibition effect was observed with the mentioned concentrations, indicating that boldine exert a similar effect in human and rat malignant glioma cells (Fig. 2).

The effects of boldine on cell damage

PI is a marker commonly used for assessing necrotic cell death [16]. Boldine treatment at 500 μ M caused a marked increase in cell death in U138-MG cell after 72 h of treatment when compared to control, as shown by the fluorescence due to PI incorporation (Fig. 3a). This increase of PI incorporation

was not observed after 24 or 48 h of treatment with any boldine concentration tested (data not shown). In U87-MG cells, however, 250 and 500 μM of boldine increased PI incorporation, and in C6 cells, boldine caused a dose-dependent increase in PI incorporation after 72 h of treatment (Fig. 3 b and c).

Boldine arrests U138-MG cells in G₂/M but not causes apoptosis

Because low concentrations of boldine (see figure 3a) did not induce any increase in PI incorporation in U138-MG cells, suggesting that the treatment did not cause apparent cell death, we wonder whether boldine could affect the progression of cell cycle in this cells. According to cell cycle distribution analysis by flow cytometry (Fig. 4), boldine increased the percentage of cells in the G₂/M phase in a dose-dependent manner after 24 h of treatment. Corroborating with flow cytometry analysis, we also observed a reduction in mitotic index, suggesting that the treatment mainly reduced cell proliferation (Fig. 5). Many agents are known to cause cell cycle arrest and also to induce cell apoptosis [24, 25]. Considering this, we tested whether boldine also induces apoptosis. We evaluated the activation of caspase-3, caspase-9 and PARP, key executioners in apoptosis, by Western blotting using specific antibodies. Any change in proteins activation was detected after treatment of 80 μM boldine for 24 h as we can see in Figure 6. The positive control used in this assay was UV-exposed organotypic hippocampal slice cultures.

The effects of boldine on DNA damage

The comet assay, a simple and effective method based upon the ability of DNA fragments to migrate out of the cell under influence of an electric field, was

used for evaluation of the effect of boldine on DNA integrity of U138-MG cells. No significant change in average comet score was observed after 24 h of treatment with the concentrations 80, 250 and 500 μM (Fig. 7). This data suggests that, at this time, treatment did not cause DNA damage.

Boldine had no toxic effect in rat brain slices

Because investigations aimed at developing anticancer agents have begun to shift away from general cytotoxic drugs, we decided to verify the toxicity of boldine in hippocampal cells as a model of normal tissue. In figure 8 we can see the effect of boldine in cells of organotypic hippocampal slices culture using the concentrations and incubation time used in glioma cells. We observed that only at a concentration of 500 μM we could see an increase in PI incorporation when compared to control, indicating cell death. Thus, our data demonstrate that boldine exerts a significant toxic effect in glioma cells, but did not affect normal cells in low concentrations.

Discussion

Gliomas remain one of the human tumors most refractory to treatment. Despite continuing advances in radiotherapy, chemotherapy, and surgical techniques, survival rate for patients remains low and other therapeutic strategies are urgently needed [26]. In the present study, we demonstrated that boldine acts strongly against glioblastoma tumors *in vitro*. It was able to decrease the

percentage of cells in U138-MG, U87-MG and C6 glioma lineages, encouraging us to explore what mechanisms could be involved in this effect.

The reduction in cell percentage in response to boldine treatment can be explained by two ways: cell death or reduced cell proliferation. Cell death can occur through different ways. Necrosis is considered a passive event in which the cell is irreversibly damaged by an environmental insult, leading to cell death [27]. In our study, we observed necrotic cells in C6 lineage after treatment. The same effect was not seen at low concentrations in U138-MG and U87-MG lineages. Thus, cell death may be dependent on cell type and boldine concentrations. So, we decided to choose U138-MG as the model to further investigate the effect of boldine.

A remaining possibility for the reduced Sulforhodamine scores as a result of boldine treatment could be reduced cellular proliferation. Cellular proliferation was measured using mitotic index and analyzing the cell cycle. The progression of cells through cell cycle depends on the activation of cyclins and cyclin dependent kinases (CDKs), which function together in the G_1 phase for initiating S and progression to G_2/M phases [28, 29]. According to cell cycle analysis by flow cytometry, boldine appeared to induce G_2/M arrest in U138-MG cells (Fig. 4). Mitotic index also showed a reduction in the percentage of cells in mitosis (Fig. 5).

Cell cycle progression from G_2 to M phase requires the activation of M-phase promoting factor (MPF), which is composed of cyclin B1 and cdc2. Mitosis is initiated by the protein kinase cdc2-cyclin B1 complex, which is activated at the end of G_2 phase by dephosphorylation of two inhibitory residues of cdc2, threonine 14 (Thr14) and tyrosine 15 (Tyr15) [30, 31]. The cdc2 protein level is constant during cell cycle progression in normally growing cells [32]. In the other hand,

cyclin B1 is synthesized at the end of the S phase and must be degraded by proteolysis before the end of the M phase [33]. In cancer cells, cell cycle regulators are commonly deregulated, so that normal growth control and checkpoints are evaded [34]. Considering this data, we speculate that boldine may interfere with phosphorylated cdc2, increasing its levels, or with cyclin B1, increasing the protein level or inhibiting the proteolysis. This effect may be an excuse of the G₂/M arrest, which may be similar with the effect of other drugs, and needs further investigation.

Next, we decided to investigate whether boldine causes apoptosis. Apoptosis is an active process and is characterized by such morphological changes as cell shrinkage, cytoplasmic blebbing, chromatin condensation, DNA fragmentation, and caspase activation [27]. However, an increasing number of reports have suggested the existence of non-apoptotic, caspase-independent programmed cell death [35, 36, 37].

Caspases have been well known to play an important role in apoptotic cell death [38]. We observed that the exposure of U138-MG to boldine for 24 h did not result in an increase on the activation of caspase-3 and caspase-9, key executioners in apoptosis. Also, no increase in cleavage of the downstream substrate PARP was observed. Boldine also did not cause DNA fragmentation, another indicator of apoptotic cells, as assessed by Comet assay. These data might indicate that boldine did not induce apoptosis in U138-MG cells, at least in a classic way.

Due to its ability to simultaneously detect moderately damaged and fragmented DNA, comet assay can identify apoptotic cells, genotoxic responses of a cell population to various treatments and assess the extent of DNA damage [39].

Comet assay results using U138-MG did not show DNA damage after boldine treatment compared to control. Various treatments, such as temozolamide (TMZ), causes extensive DNA damage, and malignant glioma cells that survive after treatment demonstrate a large amount of non-repaired DNA that consequently gives rise to variable mutations increasing the malignancy grade in the following cell generation [40]. The results obtained in present paper pointing that the effect caused by boldine plays safety role than genotoxic conditions created by other treatments.

Our data also showed that boldine may not affect hippocampal cells to the extent that it affects tumor cells, suggesting a selective toxicity to human and rat glioma cells, compared to normal brain slice derived cells, thus warranting *in vivo* studies. This result appears particularly appealing, since the tumor-specific effect plays a crucial role in anti-cancer therapies.

The identification of a novel therapy that is effective against glioma tumor could substantially impact the morbidity and median survival of patients with this disease. Thus, the combination of boldine and other anti-glioma therapies may be a hopeful strategy for the treatment of glioma that deserves further investigation.

Acknowledgments

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

References

- [1] Aygeropoulos NG, Batchelor TT (1999) New treatment strategies for malignant gliomas. *Oncologist* 4: 209-224
- [2] Davis FG, McCarthy BJ, Freels S (1999) The conditional probability of survival of patients with primary malignant brain tumors: surveillance, epidemiology, and end results (SEER) data. *Cancer* 85:85-491
- [3] Maher EA, Furnari FB, Bachoo RM et al (2001) Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes Dev.* 15:1311-1333
- [4] Weller M, Fontana A (1995) The failure of current immunotherapy for malignant glioma. Tumor-derived TGF-beta, T-cell apoptosis, and the immune privilege of the brain. *Brain Res Brain Res Rev* 21:128-151
- [5] Trog D, Fountoulakis M, Friedlein A et al (2006) Is current therapy of malignant gliomas beneficial for patients? Proteomics evidence of shifts in glioma cells expression patterns under clinically relevant treatment conditions. *Proteomics* 6: 2924-2930
- [6] Phillipson JD (2001) *Phytochemistry* 56:237-243
- [7] Newman DJ, Cragg GM, Snader KM (2003) *J Nat Prod* 66:1022-1037
- [8] Stévigny C, Bailly C, Quetin-Leclercq J (2005) Cytotoxic and Antitumour Potentialities of aporphinoid alkaloids. *Curr Med Chem- Anti-cancer agents* 5:173-182

- [9] Hidalgo ME, Farah M, Carrasco L et al (2005) Photostability and photoprotection factor of boldine and glaucine. *J Photochem Photobiol B* 80:65-69
- [10] Speisky H, Cassels BK, Lissi E et al (1991) Antioxidant properties of the alkaloid boldine in systems undergoing lipid peroxidation and enzyme inactivation. *Biochem Pharmacol* 41:1575-1581
- [11] Martínez J, Ríos L, Payá M et al (1992) Inhibition of non-enzymic lipid peroxidation by benzyloquinoline alkaloids. *Free Rad Biol Med* 12:287-292
- [12] Cederbaum A, Kikielka E, Speisky H (1992) Inhibition of rat liver microsomal lipid peroxidation by boldine. *Biochem Pharmacol* 44:1765-1772
- [13] Lanhers MC, Joyeux M, Soulimani R et al (1991) Hepatoprotective and anti-inflammatory effects of a traditional medicinal plant of Chile, *Peumus boldus*. *Planta Med* 57:110-115
- [14] Hoet S, Stévigny C, Block S et al (2004) Alkaloids from *Cassytha filiformis* and related aporphines: antitrypanosomal activity, cytotoxicity, and interaction with DNA and topoisomerases. *Planta Med* 70:407-413
- [15] Skehan P, Storeng R, Scudiero D et al (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* 82:1107-1112
- [16] Bernardi A, Jacques-Silva MC, Delgado-Cañedo A et al (2006) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs inhibit the growth of C6 and U138-MG glioma cell lines. *Eur J Pharmacol* 532:214-222

- [17] Overton WR, McCoy Jr JP (1994) Reversing the effect of formalin on the binding of propidium iodide to DNA. *Cytometry* 16:351-356
- [18] Stoppini L, Buchs PA, Muller D (1991) A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Meth* 37:173-182
- [19] Valentim LM, Rodnight R, Geyer AB (2003) Changes in heat shock protein 27 phosphorylation and immunocontent in response to preconditioning to oxygen and glucose deprivation in organotypic hippocampal cultures. *Neuroscience* 118:379-386
- [20] Horn AP, Gerhardt D, Geyer AB (2005) Cellular death in hippocampus in response to PI3-K pathway inhibition and oxygen and glucose deprivation. *Neurochem Res* 30:355-61
- [21] Tsuiki H, Nitta M, Tada M (2001) Mechanism of hyperploid cell formation induced by microtubule inhibiting drug in glioma cell lines. *Oncogene* 20:420-429
- [22] Hartmann A, Speit G (1997) The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). *Toxicol Lett* 90:183-188
- [23] Collins AR (2004) The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol* 26:249-261
- [24] Zhang W, Fei Z, Zhen H et al (2007) Resveratrol inhibits cell growth and induces apoptosis of rat C6 glioma cells. *J Neurooncol* 81:231-240

- [25]** Liu X, Wang J, Sun B et al (2007) Cell growth inhibition, G2M cell cycle arrest, and apoptosis induced by the novel compound Alternol in human gastric carcinoma cell line MGC803. *Invest New Drugs* 25:505-517
- [26]** Van den Bent MJ, Hegi M E, Stupp R (2006) Recent developments in the use of chemotherapy in brain tumours. *Eur J Cancer* 42:582-588
- [27]** Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M (1998) The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol* 60:619-642
- [28]** Morgan DO (1995) Principles of cdk regulation. *Nature* 374:131-134
- [29]** Dirks PB, Rutka JT (1997) Current concepts in neuro-oncology: the cell cycle - A review. *Neurosurgery* 40:1000-1013
- [30]** Nurse P (1990) Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* 344:504-508
- [31]** Poon RY, Chau MS, Yamashita K et al (1997) The role of CDC2 feedback loop control in the DNA damage checkpoint in mammalian cells. *Cancer Res* 57:5168-5178
- [32]** Townsley FM, Ruderman JV (1998) Proteolytic ratchets that control progression through mitosis. *Trends Cell Biol* 8:238-244
- [33]** Nishiyama A, Tachibana K, Igarashi Y et al (2000) A nonproteolytic of the proteasome is required for the dissociation of CDC2 and Cyclin B at the end of M phase. *Genes Dev* 14:2344-2357

[34] Evan GI, Vousden KH (2001) Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 411:342-348

[35] Fiers W, Beyaert R, Declercq W et al (1999) More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene* 18:7719-7730

[36] Borner C, Monney L (1999) Apoptosis without caspases: an inefficient molecular guillotine? *Cell Death Differ* 6:497-507

[37] Mochizuki T, Asai A, Saito N et al (2002) Akt protein kinase inhibits non-apoptotic programmed cell death induced by ceramide. *J Biol Chem* 277:2790-2797

[38] Hengartner MO (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407:770-776

[39] Chandna S (2004) Single-cell gel electrophoresis assay monitors precise kinetics of DNA fragmentation induced during programmed cell death. *Cytometry Part A*, 61:127-133

[40] Trog D, Moenkemann H, Breipohl W et al (2007) Non-sufficient cell cycle control as possible clue for the resistance of human malignant glioma cells to clinically relevant treatment conditions. *Amino Acids* 32:373-379

Legends to the figures

Fig. 1 Boldine reduce the percentage of U138-MG cells after treatment. Semi-confluent cultures of U138-MG were exposed to the indicated concentrations of boldine for 72 h. Percentage of cell after treatment was assessed by (a) counting cells in a hemocytometer and (b) sulforhodamine assay. Data are means \pm S.E.M. (n=5). ** $P < 0,01$ and *** $P < 0,001$ with respective control, ANOVA followed by Tukey's test.

Fig. 2 Boldine effect on U87-MG and C6 cells. Semi-confluent cultures of U87-MG (a) and C6 (b) were exposed to the indicated concentration of boldine for 72 h. Percentage of cells after treatment was assessed by sulforhodamine assay. Data are means \pm S.E.M. (n=9). * $P < 0,05$ and *** $P < 0,001$ with respective control, ANOVA followed by Tukey's test.

Fig. 3 Effects of boldine on cell death in U138-MG (a), U87-MG (b) and C6 (c) cells assessed by propidium iodide (PI) incorporation (n=3). Cells were treated with the indicated concentrations for 72 h and cellular death was analyzed visualizing PI incorporation in a Nikon inverted microscope. Panels at the top are correspondent phase photomicrographs.

Fig. 4 Effect of boldine on the cell cycle of U138-MG glioma cell line. Cells were treated with the indicated concentrations for 24 h and then subjected to flow cytometry cell cycle analysis. Data are expressed as percentage of cells in G_0/G_1 , S or G_2/M phases of the cell cycle (n=3).

Fig. 5 Mitotic index of U138-MG cells after 72 h of treatment with the indicated concentrations. After treatment, cells were fixed with 70% ethanol and stained with propidium iodide. The mitotic index was measured by counting the percentage of the cells with condensed chromosomes and nuclear envelope disassembly. Data are means \pm S.E.M. (n=3), ANOVA followed by Tukey's test.

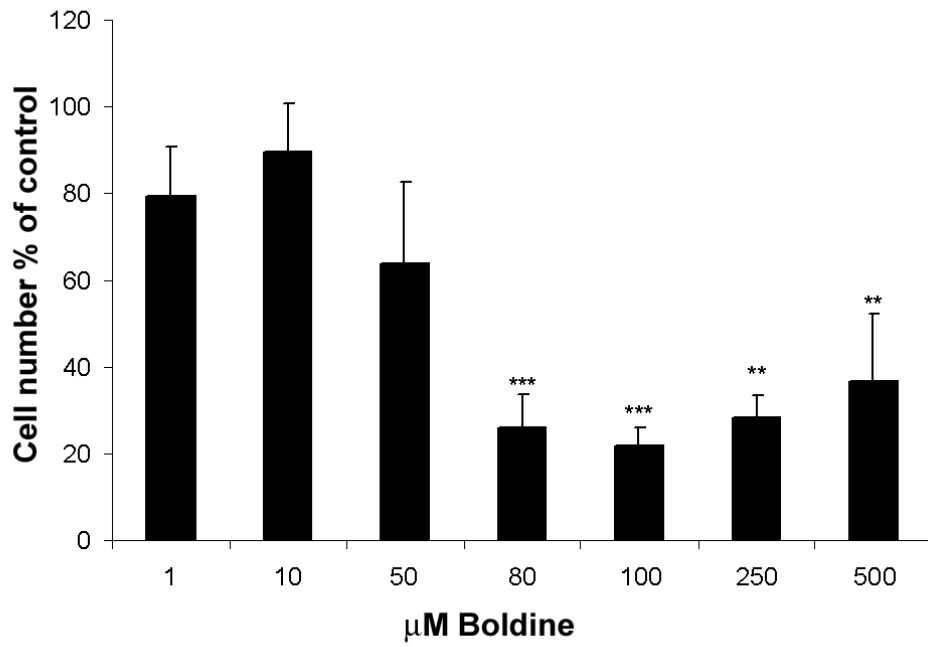
Fig. 6 Effect of boldine on activation of caspase 3 and 9 (a) and PARP cleavage (b). Cells were exposed to 80 μ M boldine for 24 h. Forms of caspase 3, caspase 9 and PARP were assessed by Western blot using the respective specific antibody (n=4). β -actin was used as internal control. Representative blots are shown.

Fig. 7 Effect of boldine on DNA strand breaks. U138-MG cells were treated with the indicated concentrations for 24 h and analyzed by comet assay. C: untreated cells, C+: positive control methyl methanosulfonate. Data are means \pm S.E.M. (n=3), ANOVA followed by Tukey's test.

Fig. 8 Effect of boldine on cell death in organotypical hippocampal slice cultures (n=6). Slices were treated with the indicated concentrations for 72 h and cellular death was analyzed visualizing PI incorporation in a Nikon inverted microscope. Representative pictures of each concentrations are shown.

Figure 1

a



b

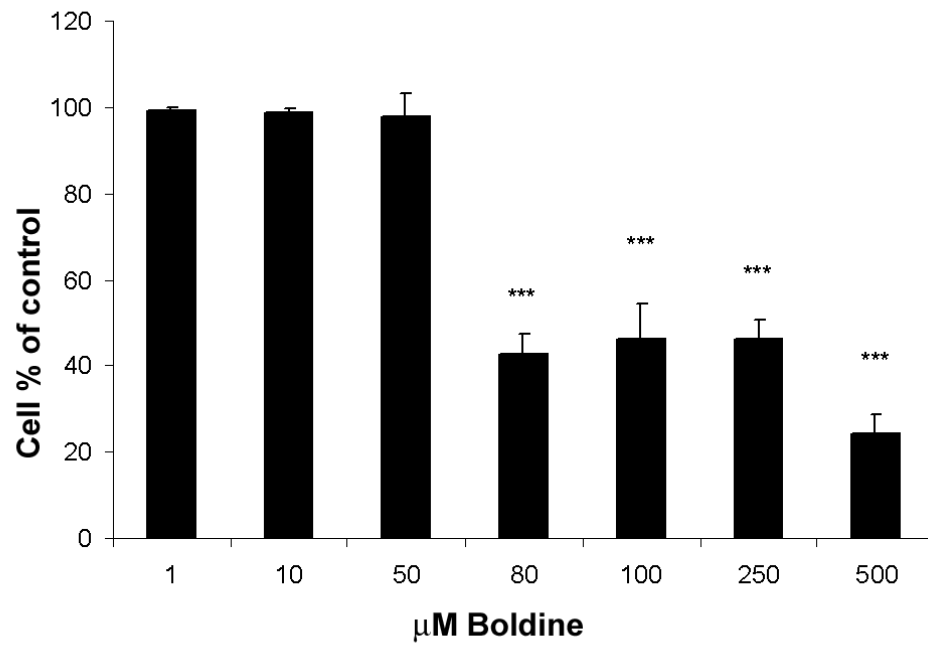


Figure 2

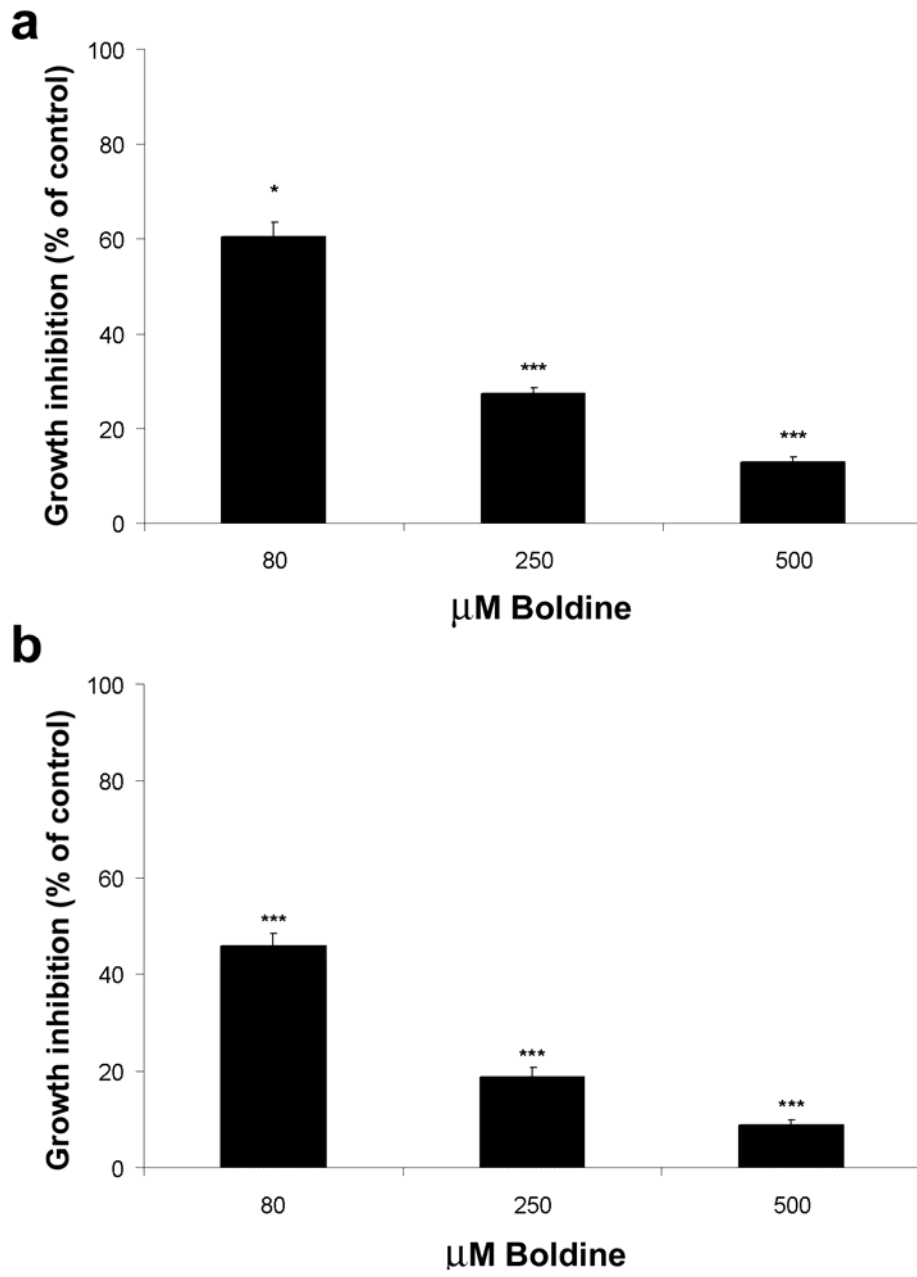


Figure 3

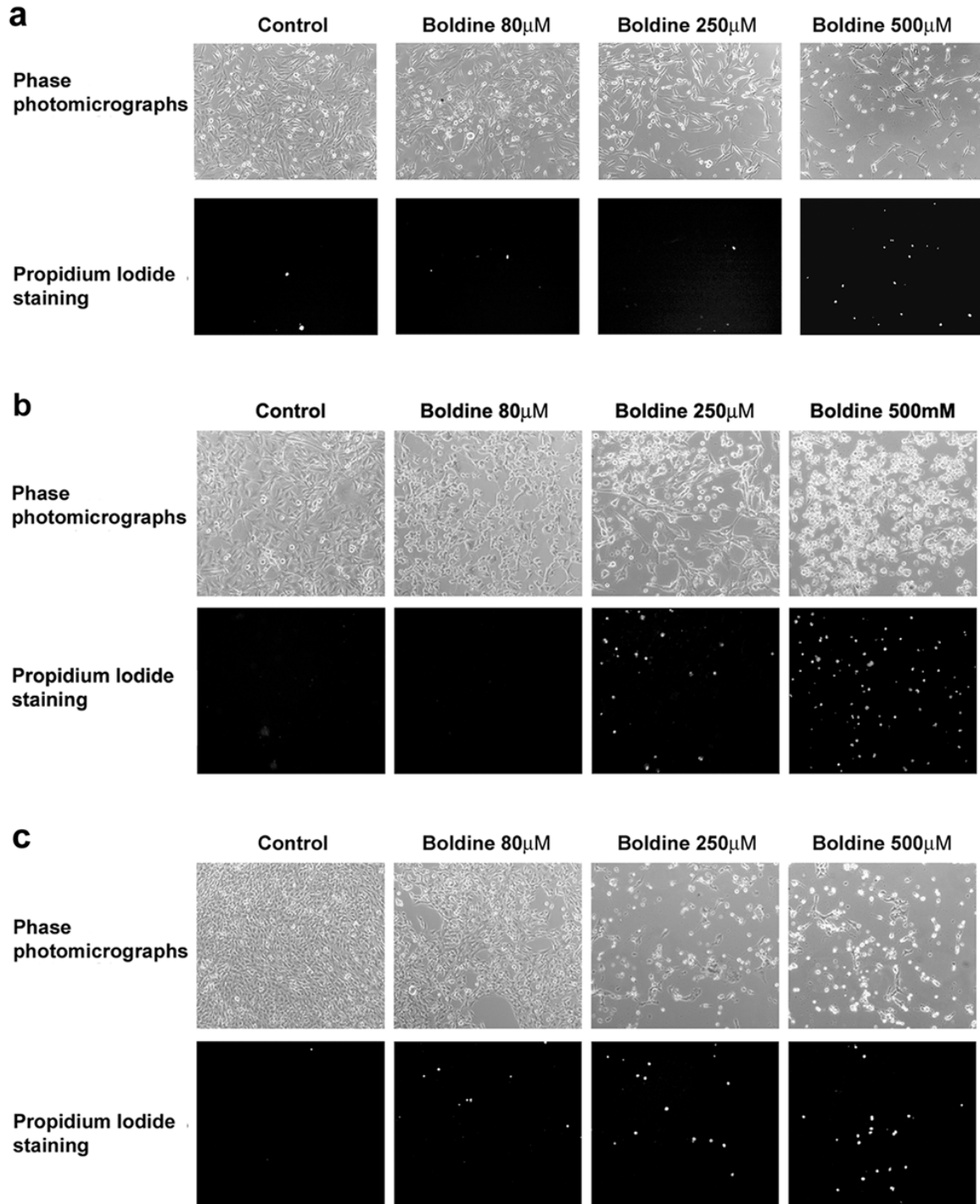


Figure 4

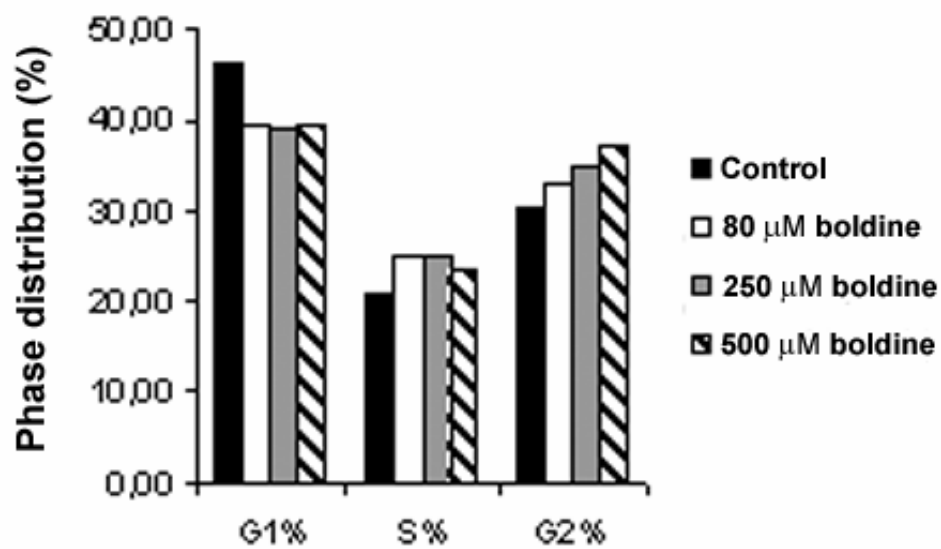


Figure 5

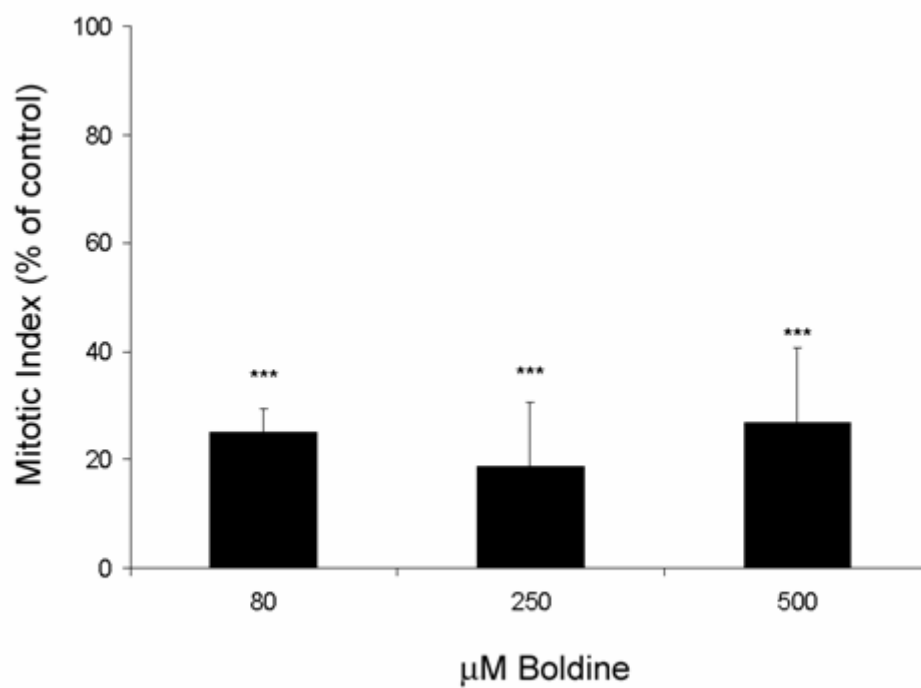
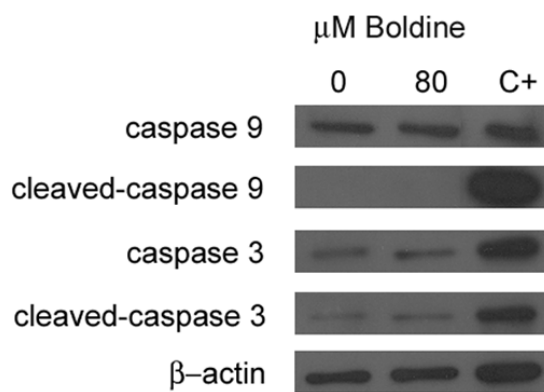


Figure 6

A



B

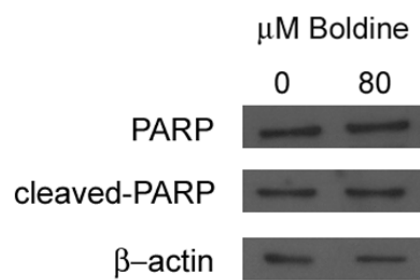


Figure 7

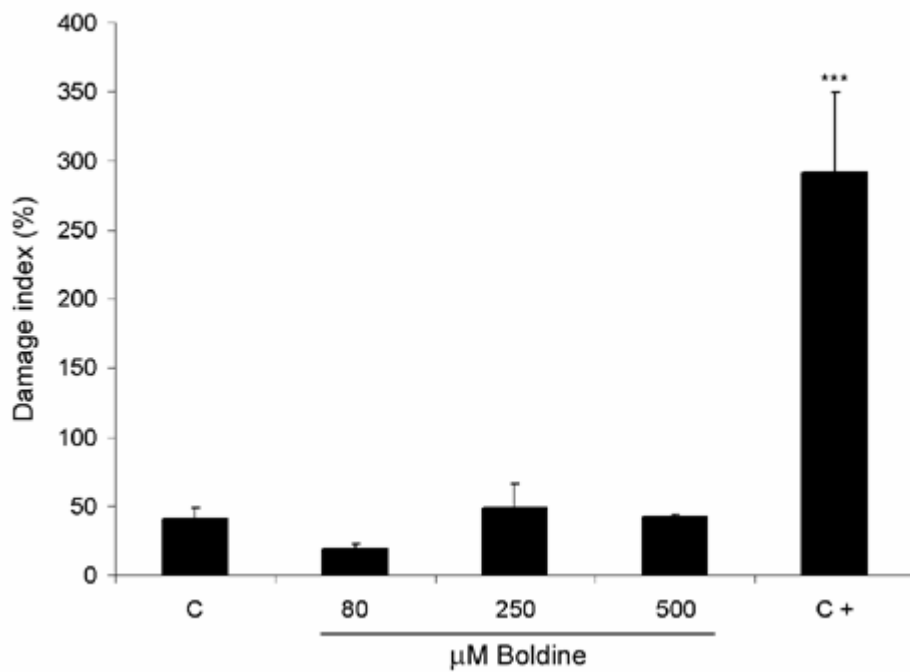
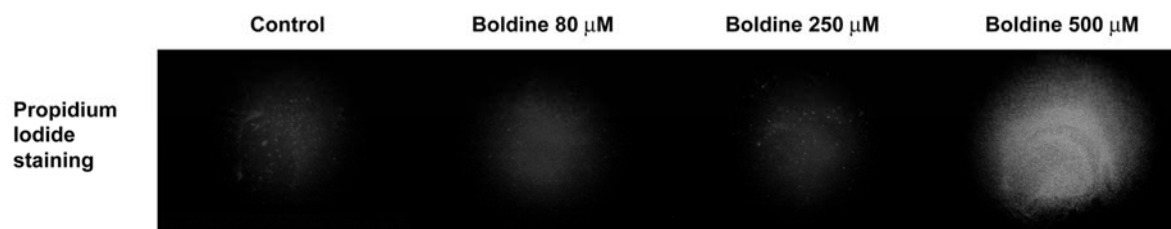


Figure 8



4. DISCUSSÃO

Os gliomas destacam-se entre os tumores humanos como sendo os mais refratários frente aos tratamentos, mesmo com o contínuo avanço da radioterapia, quimioterapia e técnicas cirúrgicas. O subtipo de maior malignidade, o glioblastoma multiforme, é particularmente agressivo, com uma média de sobrevivência de menos de um ano observada na maioria dos pacientes, mesmo para os tratados com regimes agressivos de cirurgia, radioterapia e quimioterapia (Fisher *et al*, 2007). Desta forma, novas estratégias terapêuticas fazem-se necessárias.

O uso de plantas para fins medicinais data dos homens mais primitivos. A grande diversidade de rotas biossintéticas em plantas fornece uma variedade de estruturas químicas que têm sido usadas no desenvolvimento de drogas (Phillipson, 2001). Durante as últimas décadas, trabalhos utilizando componentes naturais de plantas têm tido sucesso no que diz respeito à pesquisa sobre drogas anti-câncer (Newman *et al*, 2003).

A quimioterapia, apesar da eficácia ainda limitada, seja por falta de especificidade às células malignas ou dificuldade em atravessar a barreira hematoencefálica (Régina *et al.*, 2001), mostra-se como um campo promissor para estudos de investigação de novas substâncias que possam apresentar poder quimioterápico impedindo a proliferação das células malignas. Neste âmbito, a cultura de linhagens de células *in vitro* é um modelo experimental utilizado por vários pesquisadores uma vez que estas células apresentam características semelhantes as de um tumor *in vivo*, como alta invasividade, alta proliferação e expressão de proteínas específicas (Grobben *et al*, 2002).

Alcalóides do tipo aporfinoíde já foram relatados por seu grande potencial como agentes anti-tumorais e citotóxicos (Stévigny *et al*, 2005). Dentre eles, podemos citar a boldina, que demonstrou poder citotóxico frente à linhagem tumoral de câncer de colo uterino HeLa (Hoet *et al*, 2004). Além deste efeito, a boldina também é considerada um potente antioxidante (O'Brien *et al*, 2006). Segundo alguns autores, vários antioxidantes já foram demonstrados por possuírem atividades antiproliferativas e antitumorais, já que espécies reativas de oxigênio parecem estar envolvidas na promoção da proliferação de células neoplásicas (Slaga, 1995; Ambrosone, 2000; Martín *et al*, 2007).

Levando em consideração os dados expostos, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar o efeito do alcalóide boldina na proliferação das linhagens representativas de glioblastoma humano U138-MG e U87-MG e na linhagem de glioblastoma de ratos C6, bem como investigar os possíveis mecanismos de ação envolvidos no efeito antiproliferativo observado.

No primeiro passo, realizamos uma curva de concentrações de boldina e, através do método de contagem de células, observamos uma redução no número das mesmas a partir da dose de 80 μ M após 72 horas de tratamento para a linhagem de glioblastoma humano U138-MG. O mesmo efeito foi observado quando usamos o método de Sulforrodamina B, que nos fornece uma estimativa do percentual de células após os tratamentos comparando com o controle (células não tratadas). Após isto, resolvemos investigar se este efeito mantinha-se em outras linhagens. Para isso, utilizamos as concentrações efetivas no tratamento de U138-MG para as linhagens U87-MG e C6 e observamos o mesmo efeito de redução do percentual para células tratadas. Estes resultados indicam que a

boldina exerce um efeito similar tanto para linhagens de glioma humanos como para a linhagem de ratos.

A redução do percentual de células após os tratamentos pode ser explicada por duas maneiras: morte celular ou redução da proliferação celular. A morte celular pode ocorrer por diferentes caminhos. Dois destes já são bem descritos pela literatura: a necrose e a apoptose. A necrose é considerada um evento passivo no qual a célula é danificada irreversivelmente por um insulto do ambiente, levando à morte da mesma. Por outro lado, a apoptose é considerada um processo ativo e é caracterizada por encolhimento celular, condensação de cromatina, fragmentação de DNA e ativação de caspases (Kroemer *et al*, 1998). No entanto, um número crescente de estudos tem sugerido a existência de uma morte celular programada não apoptótica, independente de caspases (Borner & Monney, 1999; Fiers *et al*, 1999).

No presente estudo, observamos a presença de células necróticas na linhagem C6 após as três concentrações de tratamento. O mesmo efeito não foi observado nas menores concentrações de tratamento das linhagens U87-MG e U138-MG. Portanto, a morte celular parece ser dependente do tipo celular e das concentrações de boldina utilizadas. Deste modo, decidimos escolher a linhagem U138-MG como modelo para as demais investigações a respeito do efeito da boldina.

Caspases são proteínas cisteíno-proteases bem conhecidas por seu papel importante na morte celular por apoptose (Hengartner, 2000). Para verificar a possível ativação de caspases frente ao tratamento com boldina, utilizamos o método de Western blotting. Os resultados não mostraram alteração na ativação das caspases 3 e 9, proteínas executoras da apoptose. Também não verificamos

alteração na clivagem da proteína PARP (poly ADP ribose polymerase), substrato-chave das caspases. Além disso, não observamos fragmentação de DNA no ensaio de cometa, o que seria outro indicativo de apoptose. Estes dados sugerem que a boldina não induz apoptose clássica na linhagem U138-MG. No entanto, não podemos descartar a possibilidade de uma morte programada não-apoptótica, independente de caspases, como já demonstrado por autores em experimentos com outras drogas (Mochizuki *et al*, 2002).

Desta forma, outra possibilidade para explicar a redução do percentual de células após o tratamento seria a redução da proliferação celular. A proliferação celular foi medida através dos métodos de análise do índice mitótico e avaliação do ciclo celular. A progressão das células através do ciclo celular depende da ativação de ciclinas e de cinases dependente de ciclinas (CDKs), que agem em conjunto para iniciar a fase S a partir de G₁ e progredir de S para G₂/M (Morgan, 1995; Dirks & Rutka, 1997). De acordo com a análise do ciclo celular por citometria de fluxo, a boldina induziu uma parada na fase G₂/M do ciclo nas células U138-MG. A análise do índice mitótico demonstrou redução no percentual de células em mitose, indicando que a boldina possa estar agindo sobre proteínas necessárias para a progressão da fase G₂, e não sobre o segundo ponto de restrição da mitose, a anáfase.

A progressão do ciclo da fase G₂ para M requer a ativação do fator de promoção de mitose (FPM), que é composto por ciclina B1 e cdc2. A mitose é iniciada pelo complexo cdc2-ciclina B1, o qual é ativado no final da fase G₂ por defosforilação de dois resíduos inibitórios de cdc2, treonina 14 e tirosina 15 (Nurse, 1990; Poon *et al*, 1997). O nível de proteína cdc2 é constante durante a progressão do ciclo celular em células normais (Townesley & Ruderman, 1998).

Por outro lado, a ciclina B1 é sintetizada no final da fase S e deve ser degradada por proteólise antes do final da fase M (Nishiyama *et al*, 2000). Em células cancerosas, as proteínas reguladoras do ciclo celular costumam estar desreguladas, de forma que o controle de crescimento normal e os pontos de restrição sejam evadidos (Evan & Vousden, 2001). Desta forma, propomos que a boldina possa interferir nos níveis de cdc2 fosforilada, aumentando os mesmos ou impedindo sua defosforilação, já que esta é necessária para a progressão de G₂ a M. Da mesma forma, ciclina B1 também pode estar sendo afetada, tanto por aumento de seus níveis como por inibição de sua proteólise. Estas especulações podem servir para formular uma explicação da parada do ciclo em G₂/M e que necessitam maiores investigações.

As células tumorais apresentam altos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) se comparado com células normais (Szatrowski & Nathan, 1991; Toyokuni *et al*, 1995). Mesmo assim, as células tumorais são capazes de sobreviver e proliferar, indicando que os altos níveis de ROS exercem um papel importante na estimulação da proliferação (Khan & Wilson, 1995). Vários estudos demonstram que moléculas antioxidantes possuem propriedade antitumoral e antiproliferativa (Slaga, 1995; Ambrosone, 2000, Martín *et al*, 2007). A boldina é uma molécula que apresenta alta atividade antioxidante, portanto, seu efeito antiproliferativo também pode ser consequência desta atividade. Os mecanismos pelos quais moléculas antioxidantes são capazes de exercer efeito antiproliferativo ainda não são totalmente conhecidos. Acredita-se que a ativação de receptores tirosina-cinase, bem como as sinalizações desencadeadas pelos mesmos (via MAPKs, Via PI3K, via fator de transcrição NF-κB) possam estar envolvidas (Rameh & Cantley, 1999; Kamata *et al*, 2000; Martín *et al*, 2007).

Devido à habilidade de detectar simultaneamente danos moderados e fragmentação de DNA, o ensaio de cometa pode servir para a identificação de células apoptóticas, respostas genotóxicas a tratamentos e extensão de dano no DNA (Chandna, 2004). Os resultados do ensaio nas células U138-MG não demonstraram dano no DNA após tratamento. Vários tratamentos, como, por exemplo, a Temozolamida (TMZ), causam um extenso dano no DNA, e células malignas do glioma que sobrevivem após o tratamento, demonstram uma grande quantidade de DNA não reparado que, conseqüentemente, dão vazão a mutações variadas que aumentam o grau de malignidade nas gerações celulares subseqüentes (Trog *et al*, 2007). Assim, concluímos que os efeitos causados pela boldina neste estudo mostram-se mais seguros do que as condições genotóxicas criadas por outros tratamentos.

O objetivo primário dos tratamentos baseados na quimioterapia é destruir as células neoplásicas, preservando as normais. Entretanto, a maioria dos agentes atua de forma não específica, lesando tanto células malignas quanto normais, particularmente as células de rápido crescimento, como as gastrointestinais, capilares e as do sistema imunológico (Salmonm, 1998). Nossos resultados demonstraram que a boldina não afeta as células normais com a mesma extensão que afeta as células cancerosas, visto pela baixa incorporação de Iodeto de Propídeo (IP) em fatias hipocampais de ratos em cultura organotípica. Isto sugere uma toxicidade seletiva para células de glioma humano e de ratos, se comparado com células normais de tecido hipocampal, encorajando a possibilidade de estudos *in vivo*. Estes resultados são particularmente muito satisfatórios, já que o efeito específico para tumores tem papel crucial nas terapias anti-câncer.

Existem duas vias de administração principais para a terapia com adjuvantes quimioterápicos para o glioma: sistêmica (por ex. intravenosa) ou intracranial (Yu *et al*, 2006). O fato de que a boldina apresenta toxicidade diferencial pode prover a possibilidade de aplicação local no cérebro com índices terapêuticos favoráveis (menos tóxico para células neuronais, mas tóxico para gliomas). O outro fato importante é que boldina também parece apresentar poder citostático e não apenas citotóxico. Agentes citostáticos tendem a ser menos tóxicos e podem complementar potencialmente agentes indutores de apoptose.

A boldina também apresenta outros fatores que a tornam atrativa para o seu desenvolvimento como droga anti-tumoral. Entre eles podemos citar a sua hidrosolubilidade possibilitando formulações para administração sistêmica (Hidalgo *et al*, 2005), a capacidade de ser permeável e distribuída pela circulação sistêmica (Jimenez & Speisky, 2000) e uma baixa toxicidade *in vivo* (Speisky & Cassels, 1994). Além disso, autores já demonstraram que a boldina também é capaz de ultrapassar a barreira hemato-encefálica (Loghin *et al*, 2003),

A identificação de novas terapias que sejam efetivas para o tratamento de gliomas pode substancialmente melhorar a morbidade e média de sobrevivência de pacientes com esta doença. Desta forma, a combinação de boldina com outras terapias anti-glioma pode ser uma estratégia muito útil para o tratamento dos gliomas, merecendo maiores investigações.

5. CONCLUSÕES

- 1.** A boldina foi capaz de reduzir significativamente a quantidade de células tumorais após o tratamento com concentrações acima de 80 μ M em todas as linhagens de glioma utilizadas.
- 2.** A boldina induziu morte por necrose dependente do tipo de linhagem e das concentrações de tratamento utilizadas.
- 3.** Não houve diferença significativa na atividade das caspases 3 e 9, bem como na clivagem do substrato PARP após tratamento da linhagem U138-MG, sugerindo que não ocorra morte pela via clássica da apoptose.
- 4.** O tratamento com boldina por 24 h já foi capaz de induzir um aumento do número de células tumorais na fase G₂/M do ciclo celular na linhagem U138-MG.
- 5.** A boldina foi capaz de diminuir significativamente o número de células tumorais em mitose após 72 horas de tratamento para a linhagem U138-MG.
- 6.** A boldina não foi capaz de induzir efeitos genotóxicos na linhagem U138-MG, mostrando que seu efeito não ocorre via quebra das fitas de DNA.
- 7.** O tratamento em baixas concentrações não exerceu efeito citotóxico para o tecido cerebral não tumoral de ratos.

6. PERSPECTIVAS

1. Estudar vias de sinalização relacionadas à proliferação celular que possam estar envolvidas no efeito causado pela boldina *in vitro*, dando enfoque às vias MAPK/ERK, PI3K e NFκB.
2. Avaliar o efeito da boldina em tumores implantados em cérebro de ratos (estudo *in vivo*).
3. Verificar se a boldina pode apresentar efeito sinérgico com outras drogas quimioterápicas já utilizadas na clínica, numa tentativa de otimização da terapêutica (estudo *in vivo*).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abeloff MD, Armitage JO, Niederhuber JE, Kastan MB, McKenna WG. *Clinical Oncology*, 3 Ed., 2004. Em: www.mdconsult.com.br. Acesso em 11 de janeiro de 2008.
- Almeida ER, Melo AM, Xavier H. Toxicological evaluation of the hydro-alcohol extract of dry leaves of *Peumus boldus* and boldine in rats. *Phytother Res* 14:99-102, 2000.
- Ambrosone CB. Oxidants and antioxidants in breast cancer. *Antioxid Redox Signal* 2:903-917, 2000.
- Behin A, Hoang-Xuan K, Carpentier AF, Delattre J. Primary brain tumours in adults. *The Lancet* 361:323-331, 2003.
- Böhn VK. Untersuchungen über choleretische wirkungen einiger arzneipflanzen. *Arzneim-Forsch* 9:376-378, 1959.
- Borner C, Monney L. Apoptosis without caspases: an inefficient molecular guillotine? *Cell Death Differ* 6:497-507, 1999.
- Bruneton J. *Pharmacognosie: Phytochimie Plantes médicinales*, 2 Ed., Paris: Lavoisier Tec & Doc, 1999.
- Campbell JW, Pollack IF. Growth factors in gliomas: Antisense and dominant negative mutant strategies. *J Neurooncol* 35:275-285, 1997.

CBTRUS (*Central Brain Tumor Registry of the United States*). Statistical report: Primary brain tumors in the United States 1998-2002, 2005.

Chandna S. Single-cell gel electrophoresis assay monitors precise kinetics of DNA fragmentation induced during programmed cell death. *Cytometry A* 61:127-133, 2004.

Cooper GM. *A célula*, 2 Ed., Porto Alegre: ArtMed, 2001.

Dai C, Holland EC. Glioma models. *Biochim Biophys Acta* 1551:19-27, 2001.

Delourme J. Action intestinale de la boldine. *Compt Rend Hebd Acad Sci* 229:953-955, 1949.

Delso-Jimeno JL. Coleréticos y colagogos, un estudio farmacológico de la hoja de boldo. *Anales Inst Farmacol Espana* 5:395-441, 1956.

Dewick PM. The biosynthesis of C5-C25 terpenoid compounds. *Nat Prod Rep* 14:111-144, 1997.

Dirks PB, Rutka JT. Current concepts in neuro-oncology: the cell cycle - A review. *Neurosurgery* 40:1000-1013, 1997.

ESCOP (*European Scientific Cooperative on Phytotherapy Monograph on the Medicinal Uses of Plant*). United Kingdom: Exeter, 1997.

Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 411:342-348, 2001.

- Feldkamp MM, Lau N, Guha A. Signal transduction pathways and their relevance in human astrocytomas. *J Neurooncol* 35:223-248, 1997.
- Fiers W, Beyaert R, Declercq W, Vandenabeele P. More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene* 18:7719-7730, 1999.
- Fisher JL, Schwartzbaum JA, Wrensch M, Wiemels JL. Epidemiology of brain tumors. *Neurol Clin* 25:867-890, 2007.
- Grobben B, De Deyn PP, Slegers H. Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion. *Cell Tissue Res* 310:257-270, 2002.
- Guinaudeau H. Aporphinoid alkaloids V. *J Nat Prod* 57:1033-1135, 1994.
- Haas-Kogan D, Shalev N, Wong M, Millis G, Yount G, Stokoe D. Protein kinase B (PKB/Akt) activity is elevated in glioblastoma cells due to mutation of the tumor suppressor PTEN/MMAC. *Curr Biol* 8:1195-1198, 1998.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70, 2000.
- Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407:770-776, 2000.
- Hidalgo ME, Farah M, Carrasco L, Fernández E. Photostability and photoprotection factor of boldine and glaucine. *J Photochem Photobiol B* 80:65-69, 2005.

Hoet S, Stévigny C, Block S, Opperdoes F, Colson P, Baldeyrou B, Lansiaux A, Bailly C, Quetin-Leclercq J. Alkaloids from *Cassytha filiformis* and related aporphines: antitrypanosomal activity, cytotoxicity, and interaction with DNA and topoisomerases. *Planta Med* 70:407-413, 2004.

INCA (*Instituto Nacional de Câncer*). Em: www.inca.gov.br. Acesso em 10 de janeiro de 2008.

Jang YY, Song JH, Shin YK, Han ES, Lee CS. Protective effect of boldine on oxidative mitochondrial damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmacol Res* 42:361-371, 2000.

Jeremic B, Milicic B, Grujicic D, Dagovid A, Aleksandrovic J. Multivariate analysis of clinical prognostic factors in patients with glioblastoma multiforme treated with a combined modality approach. *J Cancer Res Clin Oncol* 129:477-484, 2003.

Jimenez I, Garrido A, Bannach R, Gotteland M, Speisky H. Protective effects of boldine against free radical-induced erythrocyte lysis. *Phytother Res* 14:339-343, 2000.

Jimenez I, Speisky H. Biological disposition of boldine: in vitro and in vivo studies. *Phytother Res* 14:254-260, 2000.

Kamata H, Shibukawa Y, Oka SL, Hirata H. Epidermal growth factor receptor is modulated by redox through multiple mechanisms: effects of reductants and H₂O₂. *Eur J Biochem* 267:1933-1944, 2000.

- Khan AU, Wilson T. Reactive oxygen species as cellular messengers. *Chem Biol* 2:437-445, 1995.
- Kleihues P, Cavenee WK. *Pathology and genetics of tumors of the nervous system*. Lyon: IARC Press, 2000.
- Kreitmar H. Pharmakologische Wirkung des Alkaloids aus *Peumus boldus* Molina. *Die Pharmazie* 7:507-511, 1952.
- Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol* 60:619-642, 1998.
- Kutchan TM. Alkaloid biosynthesis (mdash) the basis for metabolic engineering of medicinal plants. *Plant Cell* 7:1059-1070, 1995.
- Lanhers MC, Joyeux M, Soulimani R, Fleurentin J, Sayag M, Mortier F, Younos C, Pelt J. Hepatoprotective and anti-inflammatory effects os a tradicional medicinal plant of Chile, *Peumus boldus*. *Planta Med* 57:110-115, 1991.
- Laws ER, Shaffrey ME. The inherent invasiveness of cerebral gliomas: implications for clinical management. *Int J Dev Neurosci* 17:413-420, 1999.
- Lévy-Appert-Collin MC, Levy J. Galenic preparations from *Peumus boldus* leave (Moniniaceae). *J Pharm Belg* 32:13-22, 1997.
- Loghin F, Chagraoui A, Asencio M, Comoy E, Speisky H, Cassels BK, Protais P. Effects of some antioxidants aporphine derivatives on striatal dopaminergic transmission and on MPTP-induced striatal dopamine depletion in B6CBA mice. *Eur J Pharm Sci* 18:133-140, 2003.

- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. The WHO 2007 classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 114:97-103, 2007.
- Lutterbach J, Sauerbrei W, Guttenberger R. Multivariate analysis of prognostic factors in patients with glioblastoma. *Strahlenther Onkol* 179:8-15, 2003.
- Magistretti MJ. Remarks on the pharmacological examination of plant extracts. *Fitoterapia* 1:67-79, 1980.
- Maher EA, Furnari FB, Bachoo RM, Rowitch DH, Louis DN, Cavenee WK, DePinho RA. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes Dev* 15:1311-1333, 2001.
- Martín V, Herrera F, García-Santos G, Antolín I, Rodríguez-Blanco J, Rodríguez C. Signaling pathways involved in antioxidant control of glioma cell proliferation. *Free Radic Biol Med* 42:1715-1722, 2007.
- Mochizuki T, Asai A, Saito N, Tanaka S, Katagiri H, Asano T, Nakane M, Tamura A, Kuchino Y, Kitanaka C, Kirino T. Akt protein kinase inhibits non-apoptotic programmed cell death induced by ceramide. *J Biol Chem* 277:2790-2797, 2002.
- Morgan DO. Principles of cdk regulation. *Nature* 374:131-134, 1995.
- Mousseau M, Chauvin C, Nisou MF, Chaffanet N, Plantaz D, Pasquier B, Schaerer R, Benabid A. A study of the expression of four chemoresistance-

- related genes in human primary and metastatic brain tumors. *Eur J Cancer* 29:753-759, 1993.
- Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J Nat Prod* 66:1022-1037, 2003.
- Nishiyama A, Tachibana K, Igarashi Y, Yasuda H, Tanahashi N, Tanaka K, Ohsumi K, Kishimoto T. A nonproteolytic of the proteasome is required for the dissociation of CDC2 and Cyclin B at the end of M phase. *Genes Dev* 14:2344-2357, 2000.
- Nurse P. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* 344:504-508, 1990.
- O'Brien P, Carrasco-Pozo C, Speisky H. Boldine and its antioxidant or health-promoting properties. *Chem Biol Interact* 159: 1-17, 2006.
- Phillipson JD. Phytochemistry and medicinal plants. *Phytochemistry* 56:237-243, 2001.
- Poon RY, Chau MS, Yamashita K, Hunter T. The role of CDC2 feedback loop control in the DNA damage checkpoint in mammalian cells. *Cancer Res* 57:5168-5178, 1997.
- Quezada M, Asencio M, del Valle J M, Aguilera J M, Gómez B. Antioxidant activity of crude extract, alkaloid fraction, and flavonoid fraction from boldo (*Peumus boldus* Molina) leaves. *J Food Sci* 69:371-376, 2004.

- Rameh LE, Cantley LC. The role of phosphoinositide-3-kinase lipid products in cell function. *J Biol Chem* 274:8347-8350, 1999.
- Régina A, Demeule M, Laplante A, Jodoin J, Dagenais C, Berthelet F, Moghrabi A, Béliveau R. Multidrug resistance in brain tumors: roles of the blood-brain barrier. *Cancer Metastasis Rev* 20:13-25, 2001.
- Rempel SA. Molecular biology of nervous system tumors. *Hematol Oncol Clin North Am* 15:979-1006, 2001.
- Rombi M. *100 Plantes Medicinales. Composition, Mode D'action et Interet Therapeutique*. Paris: Romrt, 1991.
- Salmonm SE. Em: Katzung BG. *Farmacologia Básica & Clínica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., p.629-655, 1998.
- Simões CMO. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, 5 Ed., Porto Alegre: Ed. da UFRGS, 2003.
- Simões CMO, Mentz LA, Schenkel EP, Irgang BE, Stehmann JR. *Plantas da Medicina Popular no Rio Grande do Sul*. Porto Alegre: UFRGS, 1998.
- Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432:396-400, 2004.
- Slaga TJ. Inhibition of the induction of cancer by antioxidants. *Adv Exp Med Biol* 369:167-174, 1995.

- Speisky H, Cassels BK. Boldo and boldine: an emerging case of natural drug development. *Pharmacol Res* 29:1-12, 1994.
- Speisky H, Squella JA, Núñez-Vergara LJ. Activity of boldine on rat ileum. *Planta Medica* 57:519-521, 1991.
- Stévigny C, Bailly C, Quetin-Leclercq J. Cytotoxic and Antitumour Potentialities of aporphinoid alkaloids. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 5:173-182, 2005.
- Szatrowski TP, Nathan CF. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res* 51:794-798, 1991.
- Tang P, Steck PA, Yung WK. The autocrine loop of TGF- α /EGFR and brain tumors. *J Neurooncol* 35:303-314, 1997.
- Tavares DC, Takahashi CS. Evaluation of the genotoxic potencial of the alkaloid boldine in mammalian cell systems in vitro nd in vivo. *Mutat Res* 321:139-145, 1994.
- Townsley FM, Ruderman JV. Proteolytic ratchets that control progression through mitosis. *Trends Cell Biol* 8: 238-244, 1998.
- Toyokuni S, Okamoto K, Yodoi J, Hiai H. Persisten oxidative stress in cancer. *FEBS Lett* 358:1-3, 1995.
- Trog D, Moenkemann H, Breipohl W, Schueller H, Schild H, Golubnitschaja O. Non-sufficient cell cycle control as possible clue for the resistance of human malignant glioma cells to clinically relevant treatment conditions. *Amino Acids* 32:373-379, 2007.

Urzúa A, Acuña P. Alkaloids from the bark of *Peumus boldus*. *Fitoterapia* 4:175-177, 1983.

Varanda EA, Santos EC. Atividade fotoprotetora do alcalóide boldina em culturas de enterobactérias. *Revista de ciências farmacêuticas* 19:109-118, 1998.

Wrensch M, Minn Y, Chew T, Bondy M, Berger M S. Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature. *Neuro Oncol* 4:278-299, 2002.

Youn YC, Kwon OS, Han ES, Song JH, Shin YK, Lee CS. Protective effect of boldine on dopamine-induced membrane permeability transition in brain mitochondria and viability loss in PC12 cells. *Biochemical Pharmacology* 63:495-505, 2002.

Yu D, MacDonald J, Josephs S, Liu Q, Nguy V, Tor Y, Wong-Staal F, Li Q. MDDD, a 4,9-diazapyrenium derivative, is selectively toxic to glioma cells by inducing growth arrest at G0/G1 independently of p53. *Invest New Drugs* 24:489-498, 2006.