

Gabriela Bertola, Daniéli Gerhardt, Andressa Bernardi, Rudimar Frozza, Rafael Schroeder, José Claudio Moreira, Maria Isabel Edelweiss, Ana Maria Battastini, Christianne Salbego. Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Departamento de Bioquímica, Porto Alegre, RS, Brazil.

INTRODUÇÃO

Gliomas são tumores que normalmente derivam de células astrocíticas. São os tumores primários mais comuns e devastadores do Sistema Nervoso Central. Glioblastoma Multiforme (GBM), ou astrocitoma de grau IV, é a classe mais freqüente de tumores cerebrais primários e uma das mais agressivas formas de câncer. Conseqüentemente, a sobrevida após o diagnóstico fica em torno de um ano, mesmo quando os pacientes são tratados com cirurgias agressivas, radioterapia e quimioterapia comum.

Proliferação excessiva, crescimento tumoral disseminado, neovascularização extremamente rica, evasão da resposta imune e resistência a estímulos apoptóticos são as principais características dos gliomas. Suas características fazem com que o tratamento seja particularmente complicado. Novas estratégias terapêuticas se fazem necessárias com urgência.

O uso de plantas como medicamentos é conhecido desde os primórdios dos tempos. Nas últimas décadas, a investigação de compostos naturais tem sido bem sucedida no campo de pesquisa de drogas anti-câncer. Os alcalóides aporfínicos representam uma categoria interessante e potencialmente útil desses agentes. A Boldina ((S)-2,9-diidroxi-1,10-dimetóxi-aporfina) é um desses alcalóides, que está presente abundantemente nas folhas e cascas do Boldo (*Peumus boldus* Molina), árvore nativa largamente distribuída no Chile. Este alcalóide tem atraído atenção devido às suas potentes propriedades antioxidantes. Tem sido relatado que a Boldina previne danos tanto enzimáticos como não enzimáticos em sistemas biológicos. *In vitro*, inibe a propagação do dano peroxidativo em várias membranas, tais como homogeneizados de fígado e microsomas hepáticos. A Boldina também foi descrita como anti-inflamatória, hepatoprotetora, anti-*Trypanosoma* (em *Trypanosoma brucei brucei*) e citotóxica (em células HeLa *in vitro*). Entretanto, as propriedades anti-câncer deste composto não foram bem caracterizadas.

Relatamos aqui os resultados sobre o efeito do alcalóide Boldina sobre linhagens de glioma *in vitro* e *in vivo*.

RESULTADOS

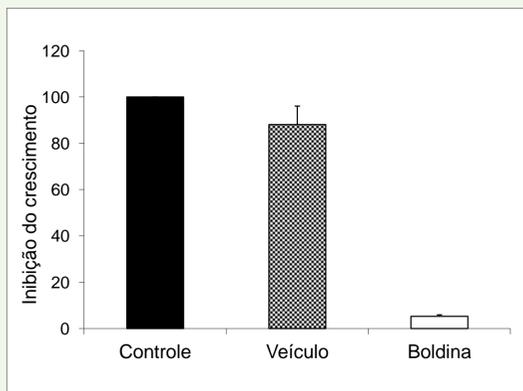


Fig. 1: Boldina reduziu o crescimento da linhagem C6 após 72 horas de tratamento com 250 μM em comparação com Controle. Média \pm D.P. (n=5), ANOVA seguido de Tukey.

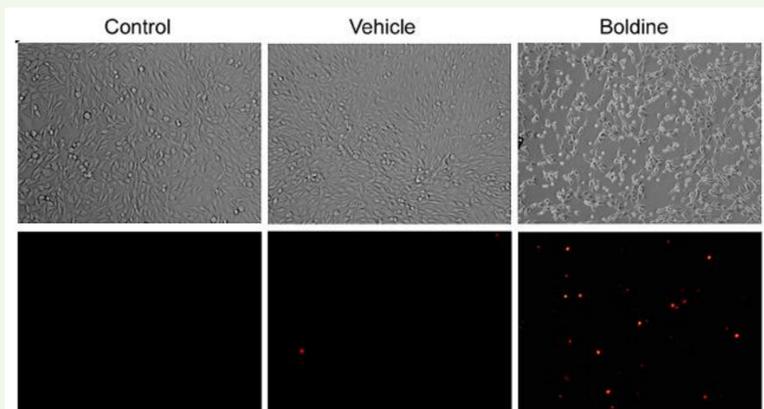


Fig. 2: Efeito da Boldina sobre a morte celular avaliado por incorporação de Iodeto de Propídeo (IP) (n=3). As células foram tratadas com 250 μM de Boldina por 72h. Os quadros superiores são correspondentes a fotografias de contraste de fase.

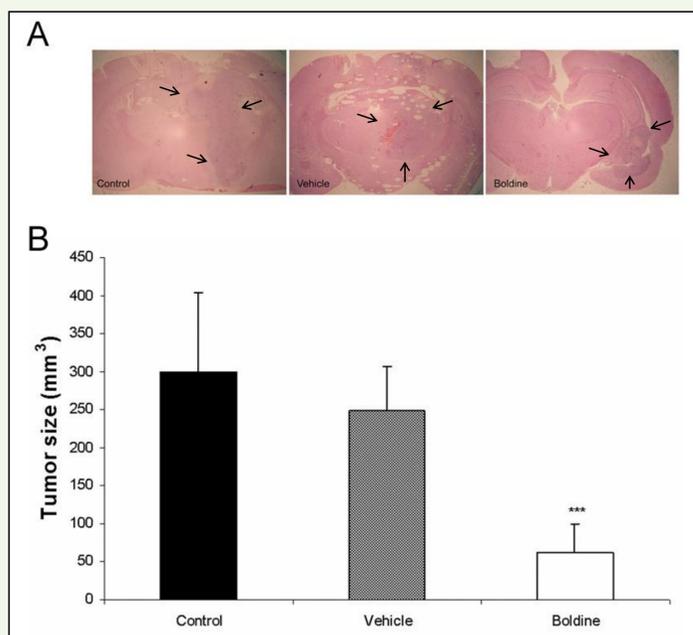


Fig. 5: Tamanho do tumor implantado, medido 20 dias após a implantação de células C6 em diferentes grupos. Ratos foram tratados com 50% etanol (Veículo) ou 50mg/Kg/dia de Boldina. (A) Fotomicrografias representativas. (B) Quantificação do tamanho tumoral. Média \pm D.P. (n=5), ANOVA seguido de Tukey.

MÉTODOS

Experimentos *in vitro*:

A linhagem C6 foi cultivada e mantida em meio DMEM acrescido de 5% de soro fetal bovino em incubadora a 37°C, com umidade de 95% e atmosfera de 5% de CO₂. As células foram semeadas em placas de 6 ou 24 poços e mantidas por 24h. Os seguintes experimentos foram feitos:

- **Ensaio com Sulforrodamina:** O ensaio foi baseado em um método de coloração de proteínas que fornece uma medida quantitativa da porcentagem de células.
- **Marcação com Iodeto de Propídeo (IP):** Para identificar morte celular, IP 5 μM foi adicionado às células de glioma 1h antes de completador 72h de tratamento com Boldina.
- **Western blot:** Anticorpos específicos contra fosfo-Akt e Akt foram usados.
- **DCF:** Foi usado para detectar produção de Espécies Reativas de Oxigênio intracelular.

Experimentos *in vivo*:

Células de glioma de rato (C6) foram injetadas no estriado direito de ratos *Wistar* machos (250 a 270 g).



O cérebro foi cortado e corado com hematoxilina e eosina para análise. Para a quantificação do tamanho tumoral, imagens foram capturadas usando uma câmera digital acoplada a um microscópio e analisadas usando Image Tool Software™.

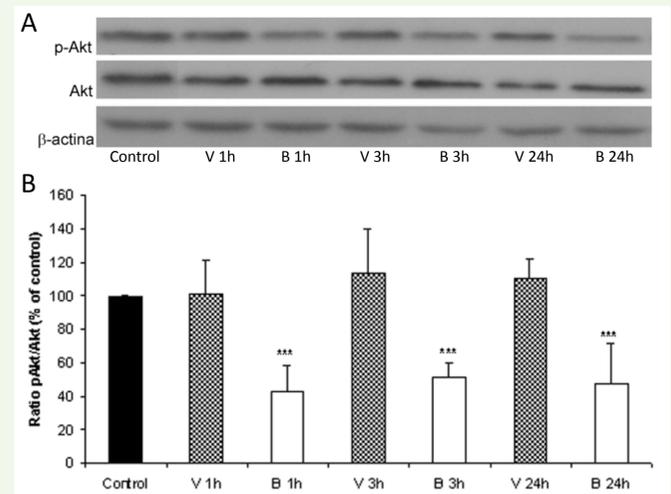


Fig. 4: Efeito da Boldina na porcentagem de proteína Akt fosforilada. As células foram tratadas com 250 μM de Boldina por 1, 3 ou 24 h. A forma fosforilada da proteína foi avaliada por Western blot através de anticorpo específico (n=4). β -actina foi usada como controle interno. Média \pm D.P. (n=5), ANOVA seguido de Tukey.

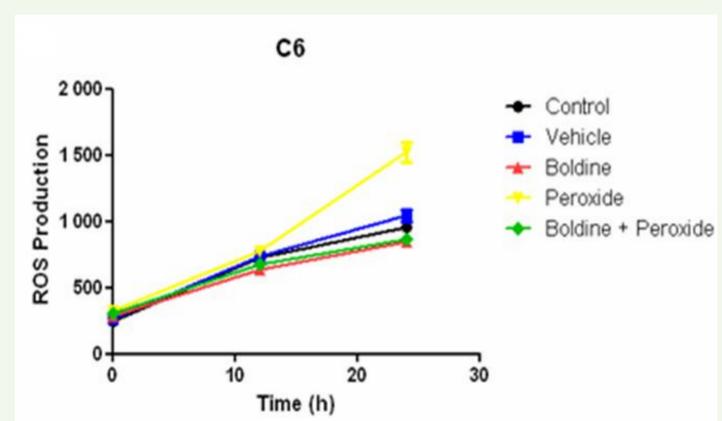


Fig. 5: Efeito da Boldina sobre a produção de Radicais Livres. Peróxido foi usado como controle positivo. Média \pm D.P. (n=3).

CONCLUSÃO

Nossos resultados mostraram que o tratamento com 250 μM de Boldina reduz a porcentagem de células da linhagem C6. Também observamos maior incorporação de IP nas células após o tratamento. Sugerimos que este efeito possa ser mediado pela inibição da proteína Akt e é independente da produção de espécies reativas de Oxigênio. Resultados preliminares dos experimentos *in vivo* demonstraram que a Boldina tem a habilidade de afetar o crescimento de tumores intracranianos. A identificação de uma nova terapia eficaz contra gliomas pode ter um impacto substancial na morbidade e na sobrevida média dos pacientes com esta doença. No geral, a combinação da Boldina com outras terapias anti-glioma pode ser uma estratégia promissora que merece uma investigação mais aprofundada.