

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA**

**Investigação do Efeito Neuroprotetor do Alcalóide Boldina Sobre
a Morte Celular Induzida Pela Privação de Oxigênio e Glicose em
Culturas Organotípicas de Hipocampo de Rato**

RICARDO ARGENTA COMIRAN

Porto Alegre, maio de 2009.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA**

**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR DO ALCALÓIDE
BOLDINA SOBRE A MORTE CELULAR INDUZIDA PELA
PRIVAÇÃO DE OXIGÊNIO E GLICOSE EM CULTURAS
ORGANOTÍPICAS DE HIPOCAMPO DE RATO**

Ricardo Argenta Comiran

Orientadora: Dra. Christianne Salbego

**Dissertação de Mestrado apresentada como
requisito parcial para a obtenção do título de
Mestre.**

Porto Alegre, maio de 2009.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo estímulo à minha educação e por todo o apoio emocional que têm me dado nos últimos meses longe da minha cidade;

Aos meus amigos de Porto Alegre, que nunca se esquecem de mim e continuam me apoiando da mesma forma;

Aos meus amigos do Rio de Janeiro por terem tornado a minha mudança um pouco menos complicada;

Aos meus colegas de sala da Difiq por terem me ajudado com os retoques finais da parte escrita do trabalho;

À Iris, minha atual chefe, por ter apoiado o término desse trabalho;

Ao CNPq pela bolsa de mestrado;

À Alessandra do Apoio pelas conversas e pelo cuidado com o nosso material de trabalho;

Um agradecimento especial a Chris, minha orientadora, por ter compreendido a minha ausência e, mesmo assim, ter me orientado até o fim, além de ser um exemplo de humanidade dentro da área de pesquisa;

E um agradecimento mais do que especial a todos os colegas do laboratório 37 pelas risadas, comilanças e por terem ajudado esse estudo a ser concluído, principalmente à Ju, à Pati, à Ana e à Dani pelo grande auxílio nos experimentos.

RESUMO

A isquemia cerebral está entre as principais causas de mortalidade e morbidade em países industrializados e, apesar dos estudos constantes, ainda não existe um tratamento eficaz. Nesse estudo, investigamos o efeito neuroprotetor da boldina, um alcalóide presente nas folhas e casca de *Peumus boldus* Molina, sobre os danos causados pela isquemia cerebral. Para isso, foi utilizado um modelo *in vitro* de privação de oxigênio e glicose (POG) em culturas organotípicas de hipocampo de rato. Nossos resultados demonstraram que o tratamento com boldina nas concentrações de 120 μM e 250 μM diminuiu significativamente a morte celular induzida pela POG de 36% para 20 e 11%, respectivamente. A boldina não apresentou efeito tóxico em condições basais em nenhuma das concentrações testadas. O efeito neuroprotetor da boldina ocorreu apenas quando ela estava presente durante o período de POG, não havendo diferença quando ela foi utilizada somente durante o período de 24 horas de recuperação. O tratamento com boldina durante a POG foi capaz de induzir ativação microglial observada 24 horas após o tratamento através da marcação com isolectina B4. Ela também causou um aumento considerável na produção de espécies reativas, o que pode ser causa ou consequência da ativação da microglia. Não foram observadas diferenças na fosforilação das proteínas Akt e GSK-3 β 24 horas após o tratamento e, portanto, alterações nessas proteínas não parecem estar envolvidas com a neuroproteção causada pela boldina. Em conjunto, os resultados sugerem um efeito neuroprotetor promissor da boldina contra os danos causados pela POG, sendo que os mecanismos que desencadeiam esse efeito devem ser melhor elucidados.

ABSTRACT

Ischemic stroke is among the major causes of mortality and morbidity in industrialized countries and, in spite of several studies, no efficient treatment is available to the patients. In this work, we investigated the neuroprotective effect of boldine, an alkaloid present in leaves and bark of *Peumus boldus* Molina, against the damage caused by an *in vitro* lesion that mimics ischemic stroke. For these experiments, we used an *in vitro* model of oxygen and glucose deprivation (OGD) in rat organotypic hippocampal slice cultures. Our results showed that the treatment with boldine in the concentrations of 120 μM and 250 μM caused a significant reduction in cellular death after OGD from 36%, observed in OGD-vehicle exposed cultures, to 20% and 11%, respectively. Boldine was not cytotoxic in basal conditions in any of the tested concentrations. The neuroprotective effect of boldine was observed when it was present during the period of OGD, showing no difference when it was used only during the recovery period of 24 hours. To elucidate a possible mechanism by which boldine exerts its neuroprotective effect we investigated the microglial activation, production of reactive species and the phosphorylation of Akt and GSK-3 β proteins involved in PI3K cell signaling pathway. Our results showed that, when used during the OGD period, boldine 250 μM induced a marked microglial activation, as shown by isolectin B4 binding, increased reactive species production, as shown by DCF-DA oxidation and had no effect on Akt and GSK-3 β phosphorylation. Taken together, the results presented here suggest a promising neuroprotective effect of boldine against the damage caused by OGD, but the mechanism of action of this compound must be better elucidated.

LISTA DE ABREVIATURAS

- Akt/PKB** - proteína cinase B
- AMPA** - *D*-amino-3-hidroxi-5-etil-4-isoxazol propionato
- AMPc** – adenosina monofosfato cíclico
- APAF-1** - fator ativador de peptidase apoptótica 1
- ATP** – adenosina trifosfato
- AVC** – Acidente Vascular Cerebral
- AVE** – Acidente Vascular Encefálico
- BAD** - promotor de morte associado a Bcl-2
- BDNF** – fator neurotrófico derivado de cérebro
- bFGF** – fator de crescimento básico de fibroblasto
- BHE** – barreira hemato-encefálica
- CA** – corno de Amon
- CREB** – elemento ligante responsivo ao AMPc
- Cyt c** - citocromo c
- DCF-DA** : diacetato de 2,7- dihidrodiclorofluoresceína
- DG** – giro denteado
- DNA** – ácido desoxirribonucléico
- eNOS** - óxido nítrico sintase endotelial
- ERK** – cinase regulada por sinal extracelular
- FBS** - soro fetal bovino
- FDA** – *Food and Drug Administration*
- FKHRL1** – *forkhead homolog (rhabdomyosarcoma) like 1*
- FSC** – fluxo sangüíneo cerebral
- GDNF** – fator neurotrófico derivado de linhagem celular glial
- GSK-3 β** - glicogênio sintase cinase-3 beta
- IKK** - I κ B cinase

IL - interleucina
I κ B - inibidor de kappa B
JNK –cinase N-terminal c-Jun
LPS - lipopolissacarídeo
MAPK - proteína cinase ativada por mitógeno
NF κ B - fator nuclear kappa B
NGF – fator de crescimento de nervo
NMDA - N-metil-*D*-aspartato
ON - óxido nítrico
PDK - proteína cinase dependente de fosfoinositóis
PI/IP - iodeto de propídeo
PIP₂ - fosfoinositídeo-4,5-bifosfato
PIP₃ – fosfoinositídeo-3,4,5-trifosfato
POG/OGD -privação de oxigênio e glicose
PI3K - fosfoinositídeo 3-cinase
PKA – proteína cinase A
PKC - proteína cinase C
PTEN - homólogo da fosfatase e tensina
ROS - espécies reativas de oxigênio
SNC - sistema nervoso central
TGF- β – fator de crescimento tumoral beta
TNF α – fator de necrose tumoral alfa
TNFR1 – receptor 1 de TNF
tPA - ativador de plasminogênio tecidual
UV – ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1. Cascata neurotóxica na isquemia e na reperfusão	06
Figura 2. Mecanismo de ativação da Akt/PKB	10
Figura 3. Regulação da sobrevivência celular através da interação da proteína Akt com diversos substratos	12
Figura 4. Imagem representativa da boldina	15

ARTIGO CIENTÍFICO

Figura 1. Effect of boldine on cell damage induced by OGD for 60 min in organotypic hippocampal cultures	46
Figura 2. Effect of treatment with 250 μ M of boldine at different periods of time on cell damage induced by OGD for 60 min in organotypic hippocampal cultures	47
Figura 3. Isolectin B ₄ reactivity in organotypic hippocampal cultures after 24 h of boldine and OGD exposure	48
Figura 4. Boldine induces reactive species generation in organotypic hippocampal cultures	49
Figura 5. Effect of treatment with boldine on the percentage of phosphorylated Akt in organotypic hippocampal cultures	50
Figura 6. Effect of treatment with boldine on the percentage of phosphorylated GSK-3 β in organotypic hippocampal cultures	51

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. As doenças neurodegenerativas	1
1.2. Acidente vascular encefálico	1
1.3. Eventos envolvidos na morte celular após a isquemia cerebral	4
1.4. Reperfusão	7
1.4.1. Neuroinflamação e microglia	7
1.4.2. Estresse oxidativo	8
1.5. O papel da via da PI3K na sobrevivência celular	9
1.5.1. A proteína Akt	9
1.5.2. A proteína GSK-3β	11
1.6. Modelos experimentais de isquemia	12
1.6.1. Modelos <i>in vivo</i>	13
1.6.2. Modelos <i>in vitro</i>	13
1.7. Boldina	14
2. OBJETIVO	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1. Culturas organotípicas de hipocampo	18
3.2. Privação de oxigênio e glucose (POG)	18
3.3. Tratamento com boldina	19

3.4. Quantificação da morte celular	19
3.5. <i>Western blotting</i>	20
3.6. Marcação com Isolectina B4 para a detecção de células microgliais ..	20
3.7. Medida da geração de espécies reativas de oxigênio	21
3.8. Análise estatística	21
4. ARTIGO CIENTÍFICO	22
5. DISCUSSÃO	52
6. CONCLUSÕES	58
7. PERSPECTIVAS	59
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

1. INTRODUÇÃO

1.1. As doenças neurodegenerativas

As doenças neurodegenerativas estão entre as principais causas de morbidade na vida adulta por afetarem funções relacionadas com a qualidade de vida do ser humano, como a memória, a cognição, a fala, a personalidade e alguns movimentos especializados. Com o aumento da expectativa de vida, essas doenças têm tornado-se cada vez mais comuns, transformando-se num problema de saúde pública. Dentre elas, podemos destacar a doença de Alzheimer, a doença de Parkinson, a esclerose múltipla e os distúrbios cerebrovasculares. A maioria dessas doenças não possui uma terapia efetiva, sendo utilizados apenas alguns tratamentos sintomáticos. Porém, nos últimos anos, grandes avanços têm sido realizados no sentido de entender melhor a fisiopatologia destas doenças e de criar modelos *in vivo* e *in vitro* com o objetivo de encontrar novos alvos terapêuticos que possam ser testados em pacientes (Price, 1999).

1.2. Acidente vascular encefálico

O acidente vascular encefálico (AVE), também conhecido como acidente vascular cerebral (AVC) ou popularmente “derrame”, é uma definição clínica utilizada para descrever sintomas neurológicos causados por uma hemorragia ou por uma isquemia cerebral, ou seja, pela diminuição de suprimento sanguíneo ao cérebro. Assim, ocorre um dano súbito e, muitas vezes, permanente no tecido cerebral irrigado pelos vasos sanguíneos afetados.

O AVE é uma das principais causas de mortalidade e morbidade entre indivíduos adultos e idosos em países industrializados. É a terceira doença que mais causa mortes nos Estados Unidos, atrás apenas da doença coronariana e do câncer (American Stroke Association, 2008). Por ano, cerca de 780 mil americanos sofrem um novo AVE, dos quais 150 mil morrem e são gastos em

torno de 65,5 bilhões de dólares em custos médicos e na manutenção de indivíduos com invalidez relacionada com AVE (American Heart Association, 2008). Estudos mostram que o problema é de igual importância no Brasil. Em 2002, foi a principal causa de morte com 87344 óbitos, sendo essa a maior taxa de mortalidade da América Latina. Apesar disso, ainda é uma doença negligenciada no país (Lotufo, 2005).

As manifestações do AVE costumam ser sutis e variam conforme a região cerebral envolvida, mas alguns sintomas são freqüentemente encontrados, como:

- Paralisia de um lado do corpo

- Problemas de visão e de fala

- Perda de memória

- Alteração de consciência, confusão ou vertigem (American Stroke Association, 2008).

O diagnóstico é feito através da sintomatologia e da história clínica, mas deve ser confirmado por exames adicionais, como tomografia computadorizada, neuroimagem por ressonância magnética, eletroencefalograma e testes de fluxo sanguíneo por ultrassom (Yamashita *et al.*, 2004; American Stroke Association, 2008).

Entre os fatores de risco para o AVE estão sexo masculino, raça negra, doença cardíaca, história familiar de doenças vasculares, fibrilação atrial, idade avançada, hipertensão, hiperlipidemia, diabetes mellitus, sedentarismo, obesidade, alcoolismo, tabagismo e uso de anticoncepcionais (Michael & Shaughnessy, 2006).

Os AVEs podem ser classificados em dois tipos principais:

- AVE isquêmico: corresponde a cerca de 83% dos casos. Ocorre como resultado da obstrução de um vaso sanguíneo que transporta sangue a uma região do cérebro, ocasionada pela formação de depósitos de gordura na parede

dos vasos. Pode ainda ser dividido em dois subtipos: trombótico, quando a placa de gordura desenvolve-se no próprio vaso que é ocluído, e embólico, quando uma placa formada em um vaso desprende-se e é carregada a um vaso de menor calibre, onde acaba obstruindo o mesmo.

-AVE hemorrágico: corresponde aos outros 17% dos casos. Ocorre quando um vaso enfraquecido rompe-se e libera sangue, que se acumula e comprime o tecido cerebral ao redor. De acordo com a localização, pode ser subdividido em hemorragias intracerebrais e hemorragias subaracnóides. Dois tipos de distúrbios dos vasos sangüíneos podem causar uma hemorragia: um aneurisma, que é uma dilatação anormal de uma artéria cerebral, levando ao enfraquecimento e ruptura da mesma, ou uma malformação arteriovenosa, um grupo de vasos sangüíneos anormalmente formados que também podem se romper (American Stroke Association, 2008).

Apesar dos constantes esforços, os tratamentos contra o AVE isquêmico existentes até o momento não são totalmente eficazes. O tratamento atualmente utilizado, e o único aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA), é a terapia trombolítica com a administração da alteplase ou tPA (tissue plasminogen activator), que tem por objetivo lisar o coágulo que está obstruindo a artéria cerebral, recuperando a circulação no local da isquemia (Atkinson & DeLemos, 2000). Essa administração deve ser feita em até 3 horas após a isquemia para ser eficaz. Entretanto, apenas de 3 a 5% dos pacientes chegam ao hospital a tempo de receberem desse tratamento (American Stroke Association, 2008). Além disso, agentes anticoagulantes, principalmente o ácido acetilsalicílico, são utilizados como profiláticos em indivíduos com fatores de risco para o AVE (Sandercock *et al.*, 2003). Porém, a maior parte dos pacientes não é tratada e, portanto, muitos estudos vêm sendo realizados com fármacos neuroprotetores, hipotermia e terapia celular com o objetivo de desenvolver novos tratamentos que possam diminuir a mortalidade, a morbidade e garantir uma melhor qualidade de vida aos pacientes de AVE (Comiran, 2006).

1.3. Eventos envolvidos na morte celular após a isquemia cerebral

O metabolismo energético normal no cérebro tem algumas características especiais, que incluem uma taxa metabólica alta, estoques de carboidratos limitados e uma alta dependência do metabolismo aeróbico de glicose. Por essa razão, ele é mais vulnerável a uma diminuição nas concentrações de oxigênio e glicose do que os outros tecidos. Além disso, o cérebro possui uma capacidade limitada de reparo a determinados danos, fazendo com que mudanças mínimas na disponibilização de oxigênio e de glicose a esse órgão possam provocar danos irreversíveis (Lipton, 1999).

Os principais processos envolvidos com a isquemia que levam à morte neuronal são o aumento do cálcio intracelular, a excitotoxicidade mediada por receptores glutamatérgicos, a formação de espécies reativas e a acidose láctica (Figura 1).

Quando os estoques de energia esgotam-se (sendo o ATP depletado pelo uso e não sintetizado devido à falta de oxigênio na cadeia respiratória), a bomba de sódio e potássio para de funcionar, o potencial de membrana é perdido e os neurônios sofrem despolarização. Conseqüentemente, os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem são ativados e aminoácidos excitatórios, particularmente o glutamato, são liberados no espaço extracelular. Ao mesmo tempo, os processos dependentes de energia, como a recaptação pré-sináptica de neurotransmissores, são bloqueados, aumentando ainda mais o acúmulo de aminoácidos excitatórios no espaço extracelular. A ativação de receptores glutamatérgicos leva ao aumento do cálcio intracelular pela abertura direta de canais de cálcio (receptores ionotrópicos), pela interação com receptores ligados a proteínas G (receptores metabotrópicos) e favorecendo a saída do Ca^{2+} do retículo endoplasmático. Como resultado da ativação glutamatérgica, íons Na^+ e Cl^- entram nos neurônios através de canais iônicos, juntamente com a água, levando a um inchamento das células (Dirnagl *et al.*, 1999).

O aumento no Ca^{2+} intracelular, um dos principais segundos mensageiros das células, inicia uma série de eventos citoplasmáticos e nucleares, causando

danos no tecido através da ativação de enzimas proteolíticas, endonucleases, lipases e outras enzimas que causam danos em vários locais da célula, levando-a à morte (Mitani *et al.*, 1993). Alguns exemplos de eventos iniciados e que resultam na morte celular são: a ativação da fosfolipase A₂ e da ciclooxygenase geram espécies reativas esgotando os estoques de antioxidantes, aumentando o dano através de peroxidação lipídica e danos na membrana; o aumento do óxido nítrico gerado pela enzima óxido nítrico sintase, que, nessas condições, também promove danos ao tecido e pode levar à apoptose e a ativação de calpaínas, proteínas ativadas por cálcio que podem ativar as catepsinas lisossomais que, uma vez ativadas, são responsáveis pela ruptura da organela e proteólise do material citoplasmático (Phillis *et al.*, 1996).

A acidose láctica também afeta drasticamente o metabolismo e as funções celulares, contribuindo, deste modo, para o dano neuronal. Os níveis de ácido láctico aumentam bruscamente devido à glicólise anaeróbica, uma fonte alternativa de ATP durante a isquemia. Este processo, juntamente com a alta pressão de CO₂, causa uma acidose que pode baixar o pH do tecido isquêmico de 7,3 para 6,0, dependendo das concentrações iniciais de glicose disponíveis para conversão em ácido láctico. Outra fonte geradora de acidose é a hidrólise do ATP que gera prótons, os quais não podem ser reciclados pela fosforilação oxidativa, pois a isquemia leva rapidamente ao seu bloqueio (Farooqui *et al.*, 1994).

Ainda não há um consenso entre o tipo de morte que ocorre após a lesão isquêmica, pois alguns pesquisadores observaram apenas necrose (Colbourne *et al.*, 1999; Yamashima, 2000), enquanto outros observaram necrose combinada com apoptose ou apenas apoptose (Zeng & Xu, 2000; Cao *et al.* 2001; Niwa *et al.* 2001; Zhan *et al.*, 2001).

Uma característica interessante é a vulnerabilidade seletiva do hipocampo à isquemia. As células piramidais da região CA1 parecem ser as mais sensíveis ao dano, enquanto as células piramidais da região vizinha CA3 e as células granulares do giro denteado (DG) são resistentes. No hilo, somente uma subpopulação de células parece ser vulnerável (Yang *et al.*, 2000).

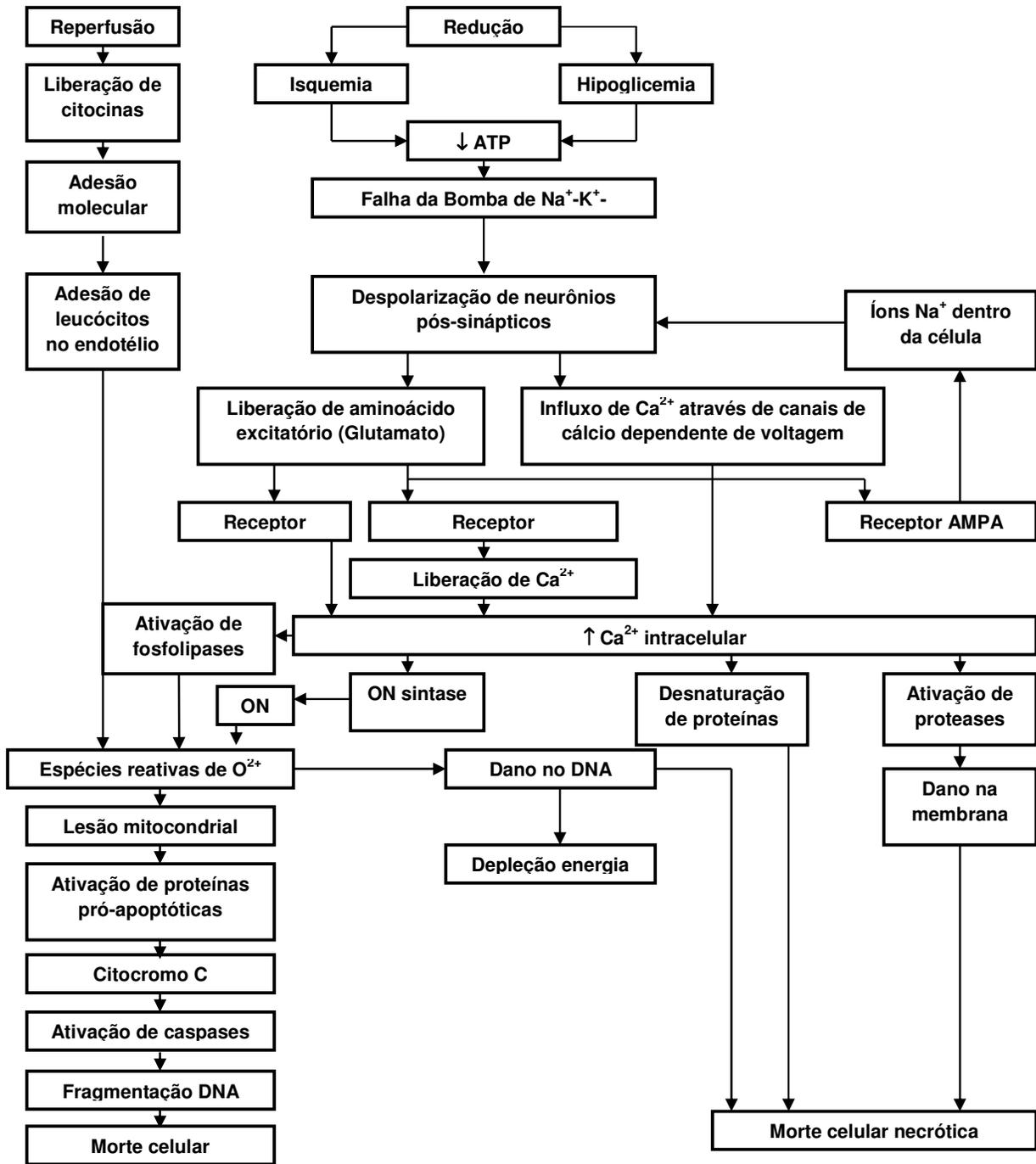


Figura 1: Cascata neurotóxica na isquemia e na reperusão. Alguns eventos principais são: despolarização descontrolada, excitação por glutamato, aumento de cálcio intracelular, geração de espécies reativas e ativação da inflamação. FSC: fluxo sanguíneo cerebral; ATP: adenosina trifosfato; AMPA: *D*-amino-3-hidroxi-5-etil-4-isoxazol propionato; ON: óxido nítrico. Adaptada de Wahlgren & Ahmed, 2004.

Outra peculiaridade da isquemia cerebral global é que nenhum dano significativo é observado até três ou quatro dias depois do insulto. Este fenômeno é conhecido como “*morte neuronal tardia*” (Bartus *et al.*, 1998; Kirino, 2000). As duas populações de células vulneráveis do hipocampo não sofrem degeneração de maneira semelhante. As do hilo degeneram dentro de 24 horas, enquanto as células piramidais da região CA1 não morrem até 3-4 dias depois do insulto. A vulnerabilidade seletiva e o atraso no início da degeneração das células da região CA1 sugerem a presença de alguns neurônios ainda viáveis que podem estar isquemicamente comprometidos, mas ainda deixam uma janela de oportunidade para intervenção farmacológica vários dias depois da isquemia (Ordy *et al.*, 1993). Pode-se ainda distinguir duas áreas com respostas diferenciadas após evento isquêmico: a área do infarto, onde ocorre a redução do fluxo sanguíneo, e a área da penumbra, ao redor da área do infarto onde se observa a morte tardia.

1.4. Reperusão

A reperusão sanguínea que ocorre após a isquemia também é responsável pela maior parte do dano às células neurais. Eventos importantes ocorridos nessa fase são a neuroinflamação, o estresse oxidativo e a ativação de vias de sinalização celular.

1.4.1. Neuroinflamação e microglia

Uma série de alterações na barreira hematoencefálica (BHE) ocorre após o insulto isquêmico, uma vez que as células endoteliais e os astrócitos que compõem esta barreira sofrem danos significativos. Assim células inflamatórias podem atravessar a BHE e alcançar o parênquima cerebral (Dugan & Choi, 1994). Entretanto, na maioria dos casos, a principal responsável pela resposta imunológica no Sistema Nervoso Central (SNC) é a microglia (Sriram & O’Callaghan, 2007).

As células da microglia se localizam no parênquima cerebral e são

consideradas os macrófagos do SNC. Estados patológicos podem levar à ativação das células microgliais, que se tornam amebóides e passam a secretar fatores relacionados à resposta imune, possuindo um importante papel na defesa do SNC e na neuroproteção (Heppner *et al.*, 1998). Entre as substâncias secretadas, destacam-se o glutamato; espécies reativas, como óxido nítrico e ânion superóxido; citocinas, incluindo TNF- α , IL-6 e IL-1 β (Koutsilieri *et al.*, 2002); catepsina B (Kingham & Pocock, 2001) e fatores de crescimento, como TGF- β , bFGF, BDNF e NGF (Morgan, 2004).

A neuroinflamação pode ser tanto benéfica quanto prejudicial, visto que os fatores secretados podem ser tóxicos ou protetores dependendo da sua concentração e dos diferentes receptores disponíveis para sua ligação (Polazzi, 2001; Bessis, 2007; Sriram & O'Callaghan, 2007).

1.4.2. Estresse oxidativo

O SNC é particularmente vulnerável ao estresse oxidativo, uma vez que utiliza grandes quantidades de oxigênio e possui concentrações baixas de antioxidantes e enzimas relacionadas, um alto conteúdo de metais de transição, muito importantes na catálise das reações geradoras de espécies reativas e um grande conteúdo de lipídios poliinsaturados, que são mais suscetíveis a oxidação por espécies reativas (Sayre *et al.*, 2008).

Durante a reperfusão, a disponibilidade de oxigênio aumenta e as mitocôndrias, já debilitadas, geram uma grande quantidade de espécies reativas de oxigênio, que levam a peroxidação lipídica das membranas dos neurônios. Observa-se também uma redução nos antioxidantes endógenos (ácido ascórbico, ácido úrico, α -tocoferol, entre outros), e os que existem são usados na tentativa de consumir os radicais que estão sendo produzidos (Phillis *et al.*, 1996; Frantseva *et al.*, 2001). Além disso, a ativação da microglia, como citado anteriormente, faz com que ela gere espécies reativas e citocinas como TNF- α aumentam a produção de espécies reativas pelas mitocôndrias (Koutsilieri *et al.*, 2002).

O estresse oxidativo, assim como a inflamação, também pode ter efeitos tanto benéficos, pois é capaz de ativar algumas vias de sinalização celular, como prejudiciais, dependendo da sua intensidade (Valko *et al.*, 2007).

1.5. O papel da via da PI3K na sobrevivência celular

A fosfoinositídeo-3 cinase (PI3K) é uma proteína que, após um estímulo, normalmente a interação de um fator de crescimento com um receptor tirosina cinase, desloca-se para a membrana plasmática, onde age sobre as moléculas de fosfoinositídeo-4,5-bifosfato (PIP₂), gerando fosfoinositídeo-3,4,5-trifosfato (PIP₃) (Cohen & Frame, 2001).

O PIP₃ age como um sinalizador intracelular e seus níveis são regulados pela ação da proteína PTEN, que é capaz de remover um grupamento fosfato da posição 3-OH da sua molécula. O aumento na concentração de PIP₃ intracelular ativa as proteínas cinase dependentes de fosfoinositóis (PDK1 e PDK2) e faz com que a proteína Akt/PKB seja recrutada para a membrana plasmática. As proteínas PDK1 e PDK2 fosforilam Akt, ativando-a. A Akt possui um papel central nessa via, podendo interagir com diversos substratos (Song *et al.*, 2005). O mecanismo de ativação da Akt pode ser melhor visualizado na figura 2.

1.5.1. A proteína Akt

A Akt foi identificada por três grupos independentes. Dois deles identificaram-na por sua homologia com as proteínas PKA e PKC, denominando-a PKB. O terceiro grupo a identificou como o homólogo celular ao oncogene retroviral v-akt, denominando-a Akt. Por isso, os dois nomes são igualmente utilizados (Song *et al.*, 2005).

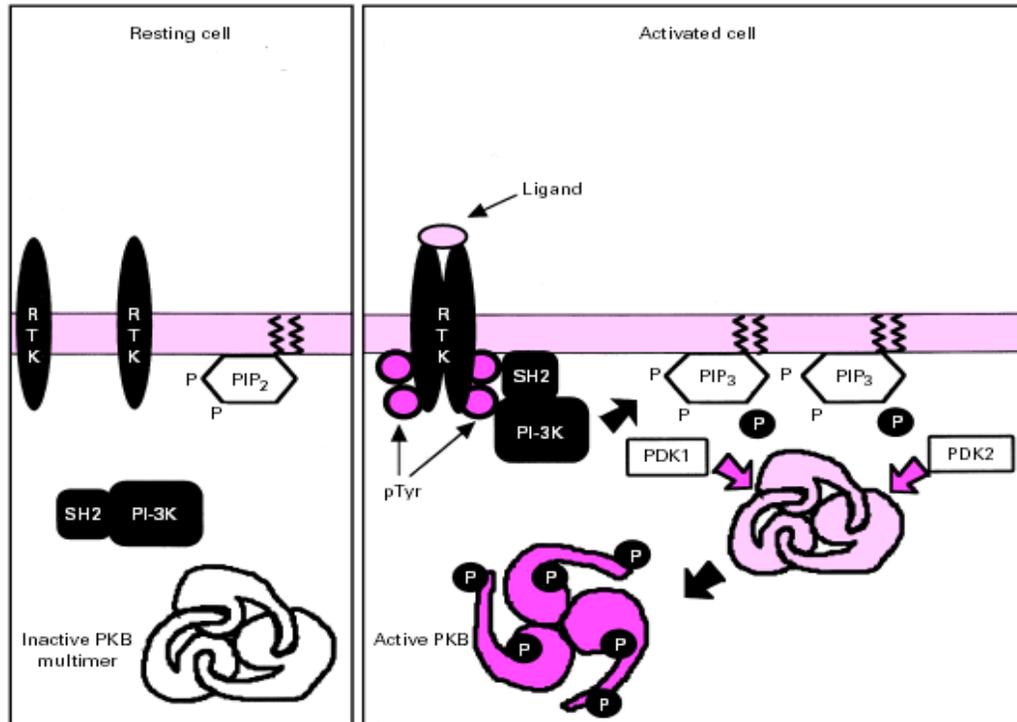


Figura 2: Mecanismo de ativação da Akt/PKB (Coffer, 1998). A ativação de um receptor tirosina cinase ativa PI3K, que forma PIP₃ a partir de PIP₂. O aumento nos níveis de PIP₃ faz com que a Akt/PKB seja deslocada para a membrana onde ela é fosforilada pelas PDKs. Akt/PKB: proteína cinase B; PDK: proteína cinase dependente de fosfoinositóis-3; PI3K: fosfoinositídeo-3 cinase; PIP₂: fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato; PIP₃: fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato; RTK: receptor tirosina cinase.

A Akt necessita ser fosforilada em Serina 473 e Treonina 308 para ser ativada. A fosforilação em Serina 473 é realizada pela PDK1, enquanto a fosforilação em Treonina 308 parece ser feita pela PDK2 (Coffer *et al.*, 1998; Belham *et al.*, 1999; Datta *et al.*, 1999).

A Akt possui uma importante participação na manutenção da sobrevivência celular. Já foi demonstrada a sua interação com as seguintes proteínas:

- caspase 9, fosforilando-a em Serina 196, inativando-a e impedindo que ela clive e ative a caspase 3, que leva a apoptose (Cardone *et al.*, 1998; Song *et al.*, 1998)

al., 2005);

- FKHL1, fazendo com que ela interaja com as proteínas 14-3-3 e fique sequestrada no citoplasma, impedindo seu translocamento ao núcleo e a ativação de genes que levam à morte celular (Brunet *et al.*, 1999);

- IKK, que fosforila I κ B, liberando o fator de transcrição NF- κ B, que regula genes ligados a imunidade, resposta a estresse, inflamação e inibição da apoptose (Ozes *et al.*, 1999)

-CREB, fosforilando-a em Serina 133, ativando-a e aumentando a transcrição de fatores ligados a sobrevivência celular (Du & Montminy, 1998);

-BAD, fosforilando-a em Serina 136 e inibindo sua ação pró-apoptótica (Song *et al.*, 2005);

-eNOS, fosforilando-a em Serina 1179, aumentando a atividade geradora de NO da enzima (Fulton *et al.*, 1999).

A Akt parece ainda interagir com a subunidade transcriptase da telomerase, sendo possível que esse também seja um alvo que possa influenciar na sobrevivência celular (Datta *et al.*, 1999). A interação da proteína Akt com seus diferentes substratos pode ser melhor visualizada na figura 3.

1.5.2. A proteína GSK-3 β

A GSK-3 β (glicogênio sintase cinase-3 beta) é mais um substrato possível da Akt, sendo inibida através de fosforilação em um resíduo Serina. A GSK-3 β possui um papel importante no metabolismo energético e sinalização por insulina, através da fosforilação da enzima glicogênio sintase. Porém, ela parece também atuar na sobrevivência celular, possuindo efeito pró-apoptótico (Pap & Cooper, 1998). Outros inibidores já conhecidos da GSK-3 β são a cascata das MAPK e a proteína PKA em resposta ao aumento nos níveis de AMPc (Cohen & Frame, 2001).

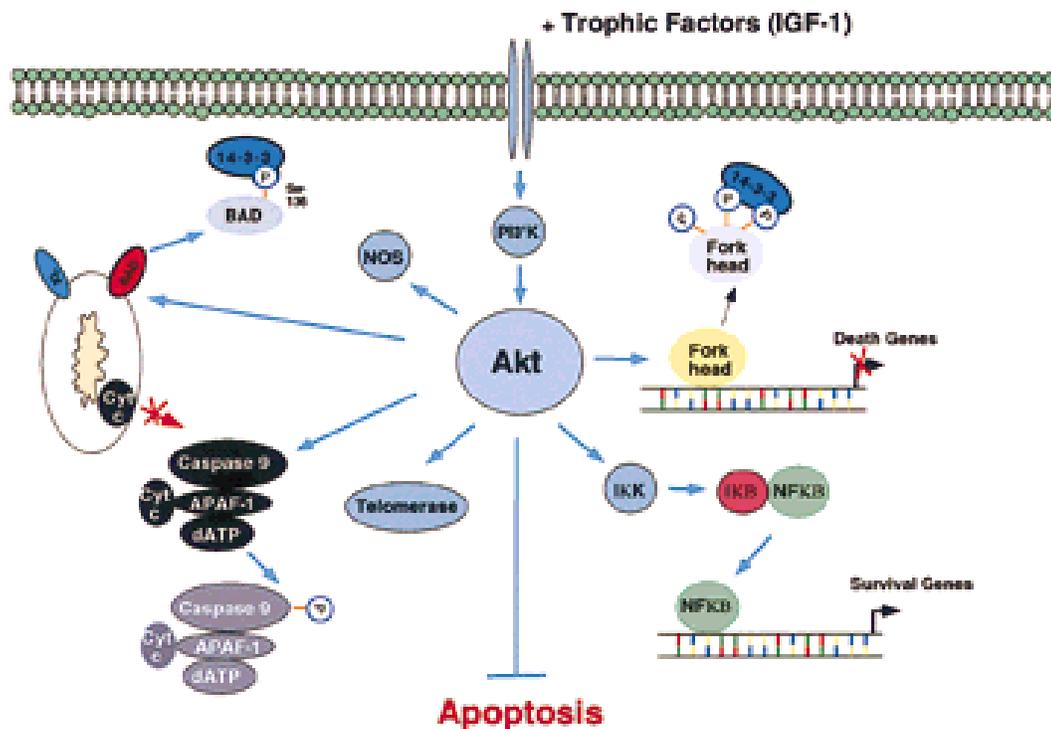


Figura 3: Regulação da sobrevivência celular através da interação da proteína Akt com diversos substratos (Datta *et al.*, 1999). Akt/PKB: proteína cinase B; APAF-1: fator ativador de peptidase apoptótica 1; BAD: promotor de morte associado a Bcl-2; Cyt c: citocromo c; dATP: deoxiadenosina trifosfato; IKK: IκB cinase; IκB: inibidor de kappa B; NFκB: fator nuclear kappa B; NOS: óxido nítrico sintase; PI3K: fosfoinositídeo-3 cinase.

Portanto, a via da PI3-K, incluindo as proteínas Akt e GSK-3β possui um papel fundamental na sinalização celular que leva a morte ou a sobrevivência celular, sendo um possível alvo para tratamentos contra patologias como a isquemia cerebral.

1.6. Modelos experimentais de isquemia

Para possibilitar o estudo dos mecanismos envolvidos na morte celular após a isquemia, assim como para estudar possíveis agentes neuroprotetores,

são utilizados alguns modelos experimentais, que são capazes de mimetizar com uma boa eficiência as condições isquêmicas que ocorrem no cérebro. Os modelos *in vivo* têm a vantagem de se aproximarem mais das condições reais, enquanto os modelos *in vitro* são mais simples para estudar os mecanismos moleculares envolvidos na morte e na neuroproteção.

1.6.1. Modelos *in vivo*

Os modelos experimentais de isquemia *in vivo* podem ser globais, quando afetam todo o cérebro, ou focais, quando afetam uma pequena região.

Isquemia global: O modelo experimental mais usado é o da oclusão dos quatro vasos principais que levam sangue ao cérebro, que inclui a cauterização das artérias vertebrais seguida de oclusão temporária das artérias carótidas comuns (Netto *et al.*, 1993; Valentim *et al.*, 2001).

Isquemia focal: Neste modelo são interrompidas artérias cerebrais específicas, afetando somente uma pequena parte do cérebro. O modelo mais comum é a oclusão da artéria cerebral média (Loetscher *et al.*, 2001).

1.6.2. Modelos *in vitro*

O modelo *in vitro* mais utilizado é o de cultura organotípica, que tem como característica o fato de manter a organização do tecido semelhante ao *in vivo*. Nesse método, as fatias de um tecido são cultivadas na interface entre o ar e um meio de cultivo, podendo permanecer por semanas (Stoppini *et al.*, 1991).

A cultura organotípica de hipocampo pode ser submetida a um modelo experimental que simula as condições de isquemia *in vivo*, o qual é chamado de privação de oxigênio e glicose (POG). Esse método consiste em expor as culturas a um meio sem glicose e a uma atmosfera saturada de nitrogênio. Essas condições simulam a interrupção do fluxo sanguíneo da isquemia (Laake *et al.*,

1999; Zamin *et al.*, 2006; Horn *et al.*, 2009).

As culturas organotípicas de hipocampo são uma excelente alternativa para o estudo da isquemia cerebral, pois mantêm muitos aspectos da isquemia *in vivo*, como a morte neuronal tardia e a vulnerabilidade seletiva (Laake *et al.*, 1999; Cimarosti *et al.*, 2001).

1.7. Boldina

A boldina, (S)-2,9-dihidroxi-1,10-dimetoxi-aporfina, é o principal alcalóide presente nas folhas e casca de *Peumus boldus* Molina, uma árvore da família Monimiaceae, também conhecida como Boldo-do-Chile (figura 4). O Boldo-do-Chile cresce abundantemente nas regiões úmidas do Chile entre as latitudes 33° e 39° sul. (O'Brien *et al.*, 2005). As folhas de Boldo contêm entre 0,4 e 0,5% de, pelo menos, 17 alcalóides diferentes da família dos derivados benzilisoquinolínicos, sendo que a boldina representa 12 a 19% do conteúdo total de alcalóides. Recentemente, a concentração total de boldina nas folhas de Boldo foi estimada em cerca de 0,14% do peso seco das folhas (Quezada *et al.*, 2004). A casca da planta contém grandes concentrações de boldina, maiores que nas folhas, chegando a 6% do peso seco da casca (Urzúa & Acuña, 1983). Embora presente em menor quantidade, a boldina também ocorre em várias outras espécies das famílias Monimiaceae, Magnoliaceae e Lauraceae (O'Brien *et al.*, 2005).

Preparações utilizando folhas e casca de Boldo, tais como infusões e chás, têm sido empregados tradicionalmente por uma grande parte da população para uma infinidade de usos, dentre os quais 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 dispepsia, da dor menstrual, da sífilis e gonorréia e ainda como sedativo e hipnótico (Speisky & Cassels, 1994). Entretanto, grande parte desses efeitos não possui estudos científicos que comprovem sua eficácia.

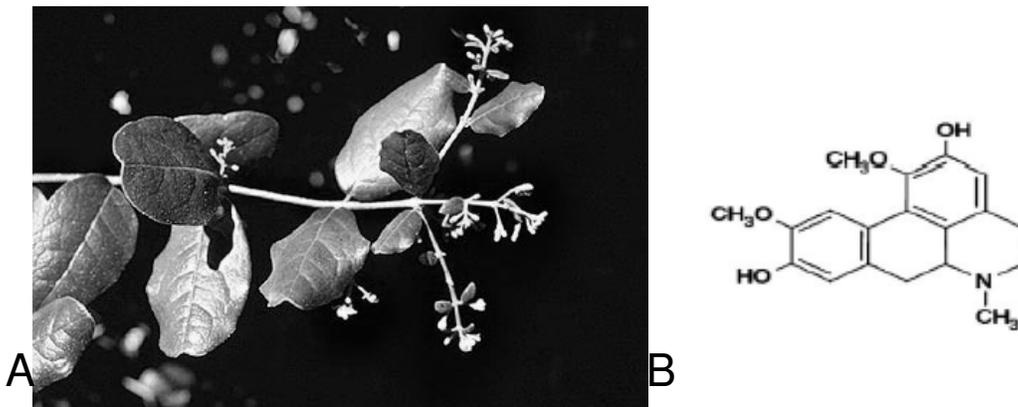


Figura 4: Imagem representativa da boldina. A: Imagem das folhas de *Peumus boldus* Molina (Missouri Botanical Garden, 2008) B: estrutura química da boldina ((S)-2,9-dihidroxi-1,10-dimetoxi-aporfina) (adaptado de O'Brien *et al.*, 2005).

Entre as atividades da boldina já demonstradas experimentalmente, estão: neuroléptica e anticonvulsivante por um provável bloqueio de receptores D2 de dopamina no sistema nervoso central (Zetler, 1988); antiinflamatória e antipirética através da inibição da síntese de prostaglandinas (Backhouse *et al.*, 1994); inibidora da agregação plaquetária (Youn *et al.*, 2002); antiarterogênica por inibição da oxidação de LDL (Santanam *et al.*, 2004); relaxante muscular; imunomoduladora; colagoga e colerética (O'Brien *et al.*, 2005). Um trabalho recente em nosso laboratório demonstrou que a boldina possui efeito antiproliferativo em linhagens de gliomas *in vitro* (Gerhardt *et al.*, *in press*).

Estudos a respeito da atividade antioxidante da boldina também são freqüentes. Muitos mostram que a boldina comporta-se como um potente antioxidante em sistemas biológicos submetidos a dano peroxidativo por espécies reativas, prevenindo a peroxidação de homogeneizados de cérebro. Além disso, a boldina protege enzimas suscetíveis a inativação por peroxidação (Speisky & Cassels, 1994). A boldina também parece atenuar o desenvolvimento de diabetes induzida por estreptozotocina em ratos devido a sua capacidade antioxidante (Jang *et al.*, 2000). Em pesquisas com o objetivo de elucidar o mecanismo de ação

da boldina, foi demonstrado que ela atua como uma importante sequestradora de radicais hidroxila, além de possivelmente diminuir a produção de óxido nítrico pela mitocôndria (Youn et al., 2002), mas parece reagir muito pouco ou não reagir com radicais superóxido (Cederbaum et al., 1992; Jang et al., 2000). Porém, Konrath e colaboradores (2008) demonstraram que a boldina também pode ter efeito pró-oxidante dependendo da concentração utilizada.

A longa tradição do uso popular de preparações de Boldo contendo boldina sugere que ela possui uma baixa toxicidade. Doses relativamente altas são necessárias para induzir efeitos adversos, toxicidade ou mortalidade em diversas espécies de mamíferos. Estudos demonstraram que 500 e 1000 mg/kg, via oral, foram necessários para matar camundongos e porcos da Índia, respectivamente. Quando a via de administração foi intravenosa, foram necessárias doses de 250 e 50 mg/kg, respectivamente, e 25 mg/kg para gatos. A maioria dos animais morreu por insuficiência respiratória (Speisky & Cassels, 1994). Doses de 500 mg/kg por via oral não induzem reabsorção ou malformação fetal em ratas prenhas. Porém, efeitos abortivo e teratogênico significativos foram observados quando a dose administrada foi de 800 mg/kg. Em estudos de toxicidade a longo prazo, um baixo grau de hepatotoxicidade foi observado, através do aumento dos níveis de transaminases e uréia no sangue, em ratos tratados com 800 mg/kg de boldina por via oral durante 30 e 60 dias, mas não nos ratos tratados com 500 mg/kg. Não foram observadas modificações histológicas no fígado dos ratos tratados com 800 mg/kg por 90 dias (Almeida *et al.*, 2000).

A observação de que a boldina possui uma baixa toxicidade em mamíferos, aliada ao fato de ela ser um potente antioxidante e de o estresse oxidativo ser um importante processo envolvido na morte neuronal após a isquemia, nos fez construir a seguinte hipótese de trabalho: a boldina pode ter um efeito neuroprotetor na morte celular desencadeada pela isquemia.

2. OBJETIVOS

Para comprovar nossa hipótese de trabalho nossos objetivos foram:

OBJETIVO GERAL:

- Investigar o efeito neuroprotetor do alcalóide boldina no modelo de privação de oxigênio e glicose em culturas organotípicas de hipocampo de ratos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Testar o efeito neuroprotetor de diferentes concentrações de boldina no modelo de privação de oxigênio e glicose em culturas organotípicas de hipocampo de ratos.
- Testar o tratamento com boldina em diferentes tempos: antes, durante e após a privação de oxigênio e glicose.
- Avaliar o efeito da boldina sobre a ativação microglial.
- Avaliar o efeito da boldina como “scavenger” de espécies reativas geradas durante o período de reperfusão.
- Avaliar a participação da via da PI3-K na neuroproteção causada pela boldina, através da quantificação da fosforilação das proteínas Akt e GSK-3 β .

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Culturas organotípicas de hipocampo

As culturas organotípicas de hipocampo foram preparadas de acordo com o método de Stoppini e colaboradores (1991). Todos os procedimentos usados seguiram os princípios de “Cuidados com Animais de Laboratório” do Instituto Nacional de Saúde (National Institutes of Health – NIH) e foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os hipocampos de ratos de 6-8 dias foram fatiados em 400µm através de um fatiador de tecido *Mcllwain chopper* (The Mickle Laboratory Engineering Co), as fatias transferidas às membranas Millicell e estas para placas de cultivo de 6 poços sob condições estéreis. As culturas foram mantidas por um período de maturação de 14 dias a 37°C e 5% de CO₂, sendo o meio de cultivo trocado duas vezes por semana.

3.2. Privação de oxigênio e glucose (POG)

A exposição das culturas à POG foi feita de acordo com o método de Strasser e Fischer (1995), com algumas modificações (Zamin *et al.*, 2006). Após 14 dias de cultivo, as membranas foram transferidas para uma placa de 6 poços contendo meio de POG (sem glicose). Após, o meio foi trocado por outro com a mesma composição previamente borbulhado com N₂ por 30 minutos. A placa foi, então, transferida para uma câmara anaeróbica a 37°C com atmosfera enriquecida com N₂ por 60 minutos. Durante esse processo, as fatias controles foram mantidas na incubadora com atmosfera de 5% CO₂ a 37°C. Após esse período, as culturas foram incubadas em meio de cultivo por 24 horas, correspondendo ao período de recuperação.

3.3. Tratamento com boldina

A boldina foi obtida da Spectrum® (Nova Jersey, EUA) e foi dissolvida em água milli-Q. No primeiro grupo de experimentos, foi testado o efeito de diferentes concentrações de boldina: 60, 120 e 250 μM . A droga foi adicionada 2 horas antes da POG e mantida durante os períodos de POG e recuperação. As culturas expostas à POG foram comparadas com seus respectivos controles.

No segundo grupo de experimentos, escolhemos a concentração de 250 μM e a testamos em diferentes períodos de tratamentos, havendo 6 grupos experimentais: 1) culturas controle, não expostas à POG nem tratadas com boldina; 2) culturas expostas à POG sem tratamento; 3) culturas expostas à POG tratadas com boldina durante 2 horas antes da POG, durante a POG e durante o período de recuperação de 24 horas; 4) culturas expostas à POG tratadas com boldina durante a POG e durante o período de recuperação de 24 horas; 5) culturas expostas à POG tratadas com boldina apenas durante a recuperação; 6) culturas expostas à POG tratadas com boldina apenas durante a POG.

3.4. Quantificação da morte celular

A intensidade de morte celular foi analisada pela avaliação da incorporação do corante iodeto de Propídio (IP) (Noraberg et al., 1999). Após um período de recuperação de 23 horas, 5 μM de IP foram adicionados às culturas e incubados por 1 hora. As culturas foram observadas em microscópio invertido usando um filtro padrão de rodamina. As imagens foram capturadas e analisadas através do programa de análise de imagens Scion Image (<http://www.scioncorp.com>). A porcentagem de morte celular foi calculada pela razão entre a área da figura marcada com iodeto de propídeo pela área total do hipocampo.

3.5. Western blotting

Para a análise da fosforilação e do imunoconteúdo das proteínas Akt e GSK-3 β , as fatias foram homogeneizadas em solução de lise 24 horas após a POG e uma alíquota foi retirada para determinação da quantidade de proteínas (Peterson, 1983). As proteínas foram separadas por eletroforese SDS-PAGE (10%). Após a eletroforese, as proteínas foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose utilizando um aparato de transferência semi-seco (Bio-Rad, Trans-Blot SD, Hercules, CA, USA). As membranas foram incubadas por 60 min a 4°C com solução de bloqueio (Tampão Tris contendo 5% de leite em pó e 0,1% de Tween-20, pH 7,4) seguido pela incubação durante 18 horas com os anticorpos para as proteínas de interesse dissolvidos na solução de bloqueio. Após a incubação com os anticorpos primários, as membranas foram incubadas com os anticorpos secundários IgG conjugados à peroxidase por duas horas. O ensaio de quimioluminescência foi detectado utilizando filmes de raio-X. Estes filmes foram escaneados e a percentagem da intensidade das bandas foi analisada usando o programa Optiquant (Packard Instrument). Foi utilizada imunodeteção para β -actina como controle de carregamento.

3.6. Marcação com Isolectina B4 para a detecção de células microgliais

Do mesmo modo descrito acima, as proteínas foram separadas por eletroforese SDS-PAGE (8%) e eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose utilizando um aparato de transferência semi-seco. As membranas foram incubadas a 4°C em solução de PBS/albumina 5% e, em seguida, em solução de PBS contendo 0,05% de Tween e 0,125 μ g/mL de Isolectina B₄ conjugada à peroxidase. O ensaio de quimioluminescência foi detectado utilizando filmes de raio-X e a percentagem da intensidade das bandas foi analisada usando o programa Optiquant. LPS 2 μ g/mL foi incubado por 24 horas nas culturas para ser usado como controle positivo.

3.7. Medida da geração de espécies reativas

Após 14 dias de cultura, as fatias foram lavadas com HBSS pH 7,4, removidas cuidadosamente das membranas e transferidas para placas de 96 poços pretas contendo meio com 30 μ M de DCF-DA (diacetato de 2,7-dihidroclorofluoresceína). As fatias foram incubadas a 37°C no escuro por 30 minutos. A intensidade de fluorescência do DCF foi medida durante os 120 minutos subseqüentes utilizando um comprimento de onda de excitação de 485 nm e comprimento de onda de emissão de 535 nm.

3.8. Análise estatística

Os dados obtidos nestes experimentos foram analisados estatisticamente pela análise da variância de uma via (ANOVA), seguidos pelo teste post-hoc Tukey. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão. A diferença entre as médias foi considerada significativa quando $p < 0.05$.

4. ARTIGO CIENTÍFICO

NEUROPROTECTIVE EFFECT OF BOLDINE AGAINST OXYGEN AND GLUCOSE DEPRIVATION IN HIPPOCAMPAL ORGANOTYPIC SLICE CULTURES

Artigo a ser submetido ao periódico Neurochemical Research

**NEUROPROTECTIVE EFFECT OF BOLDINE AGAINST OXIGEN AND
GLUCOSE DEPRIVATION IN HIPPOCAMPAL ORGANOTYPIC SLICE
CULTURES**

Ricardo Argenta Comiran¹, Ana Paula Horn¹, Daniéli Gerhardt¹, Juliana Bender Hoppe¹, Patrícia Bencke Grudzinski¹, Rudimar Frozza¹, and Christianne Salbego^{1,*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS,
Rua Ramiro Barcelos 2600, 90035.003, 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

Ischemic stroke is among the major causes of mortality and morbidity and no efficient treatment already exists. We investigated the neuroprotective effect of boldine in organotypic hippocampal cultures exposed to oxygen and glucose deprivation (OGD), which mimics ischemic conditions. Our results showed that treatment with boldine at concentrations of 120 μM and 250 μM caused a significantly reduction in cellular death after OGD. The neuroprotective effect of boldine was observed when it was added during the OGD. Trying to elucidate the mechanism of action of boldine, we showed that boldine 250 μM induced microglial activation, evaluated by isolectin B4 binding, increased reactive species production and had no effect on Akt and GSK-3 β phosphorylation. Taken together, the results suggest a promising neuroprotective effect of boldine against the damage caused by an ischemic stroke, but the mechanisms involved in such neuroprotection must be better elucidated.

Keywords: oxygen and glucose deprivation, neuroprotection, boldine, organotypic hippocampal culture, microglial activation, oxidative stress.

Introduction

Ischemic stroke is an important cause of disability and death in industrialized countries. It results from a transient or permanent reduction in cerebral blood flow that leads to a complex of cell events resulting in neuronal death [1, 2]. Despite continuous attempts, the therapy to treat patients that suffer an ischemic event is still ineffective.

Several *in vitro* and *in vivo* models have been used to study the mechanisms underlying neuronal degeneration and to evaluate potential neuroprotective effects of pharmacological treatments. Among the *in vitro* systems used to study ischemia-induced injuries, organotypic hippocampal slice cultures, combined with oxygen–glucose deprivation (OGD), offer great advantages because they mimic closely the *in vivo* condition. Cultured slices maintain their cell architecture and interneuron connections, and neurons survive during the long-term culture and physiologically mature over this period, allowing an extended survival study [3, 4, 5].

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 [6]. Studies showed that boldine has a strong antioxidant potential and 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 in brain homogenate [7] and seems to be an hydroxyl radical scavenger [8]. However, it seems to have a pro-oxidant effect depending on its concentration [9]. Boldine

has also been described to have other biological activities such as neuroleptic [10], anti-inflammatory, antipyretic [11], platelet aggregation inhibitor [8], antiarteriogenic [12] and immunomodulator [6]. Besides, relatively high doses of boldine are needed to induce toxic effects or death in mammals [7, 13].

Microglial cells are considered the brain macrophages and are activated in cerebral diseases. However, there is conflicting evidence about whether they promote neuronal survival or exacerbate neuronal death [14]. Activated microglia is able to release glutamate, growth factors like TGF- β , bFGF, BDNF and NGF and cytokines like TNF- α , IL-6 and IL-1 β [15]. It also produces nitric oxide and superoxide anion, being a major responsible for the oxidative stress that occur after lesions [16].

Phosphoinositide3-kinase (PI3K) pathway is believed to be an important anti-apoptotic signal pathway in neurons. Akt, also known as protein kinase B, is a downstream kinase of PI3K, and the phosphorylation of residues Thr308 and Ser473 is required for its activity. Akt seems to have a key role on cell survival by phosphorylating a large number of substrates [17]. One way by which active Akt mediates its anti-apoptotic effects is by phosphorylating and inactivating glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) [18], an enzyme highly related in triggering cell death.

Since boldine is a candidate to be a neuroprotectant compound and there is a lack of studies investigating boldine's possible effects after ischemic damage, we used organotypic cultures of rat hippocampus exposed to an *in vitro* model of ischemia (oxygen and glucose deprivation) in order to investigate if boldine has the capacity to rescue cells from death.

Experimental Procedure

Organotypic hippocampal slice cultures

Organotypic hippocampal slice cultures were prepared according to the method of Stoppini *et al.* [19]. Briefly, 400- μ m-thick hippocampal slices were prepared from 6 to 8-day-old male Wistar rats using a McIlwain tissue chopper (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) and separated in ice-cold Hank's balanced salt solution (HBSS) composed of (mM): glucose 36, CaCl₂ 1.26, KCl 5.36, NaCl 136.89, KH₂PO₄ 0.44, Na₂HPO₄ 0.34, MgCl₂ 0.49, MgSO₄ 0.44, HEPES 25; fungizone 1% (Gibco, Grand Island, NY, USA) and gentamicine 36 μ l/100 ml (Schering do Brasil, São Paulo, SP, Brazil); pH 7.2. The slices were placed on Millicell culture insert (Millicell®-CM, 0.4 μ m, Millipore®, Bedford, MA, USA) and the inserts were transferred to a 6-well culture plate (Cell Culture Cluster, Costar®, New York, NY, USA). Each well contained 1 ml of tissue culture medium consisting of 50% minimum essential medium (Gibco), 25% HBSS (Gibco), 25% heat inactivated horse serum (Gibco) supplemented with (mM, final concentration): glucose 36, HEPES 25 and NaHCO₃ 4; fungizone 1% (Gibco) and gentamicine 36 μ l/100 ml (Schering do Brasil); pH 7.2. Organotypic cultures were maintained in a humidified incubator gasified with 5% CO₂ atmosphere at 37°C. Culture medium was changed twice a week.

Oxygen and glucose deprivation (OGD)

OGD was achieved by combining hypoxia with aglycemia, according to the method described by Strasser and Fischer [20], with some modifications [4]. After 14 days in vitro, the inserts were transferred to a sterilized 6-well plate and incubated with 1 ml of OGD medium consisting of HBSS lacking glucose for 15 min to deplete glucose from intracellular stores and extracellular space. After that, the medium was changed for one with the same composition but previously bubbled with N₂ for 30 min and the plate transferred to an anaerobic chamber at 37°C with N₂-enriched atmosphere for 60 min. During this process control slices were maintained in an incubator with 5% CO₂ atmosphere at 37°C. After the deprivation period, slice cultures were incubated in culture medium under normoxic conditions for 24 h, corresponding to the recovery period.

Boldine treatment

Boldine was purchased from Spectrum® (New Jersey, USA) and was dissolved in milli-Q water. For the first set of experiments we tested the effect of different boldine concentrations: 60, 120 and 250 µM. The drug was added to the medium 2h before OGD and was maintained during the OGD exposure and during the recovery period (24h). We had eight experimental groups: 1) control cultures not exposed to OGD and not treated with boldine; cultures not exposed to OGD and treated with 2) boldine 60 µM or 3) boldine 120 µ M or 4) boldine 250 µM; 5) cultures exposed to OGD without treatment and 6-8) cultures exposed to OGD treated with 60, 120 or 250 µM of boldine. For the second set of experiments we choose the boldine concentration of 250 µM and tested different period of

treatment. Here we had six experimental groups: 1) control cultures, not exposed to OGD neither treated with boldine; 2) OGD exposed cultures without treatment; 3) treatment 1- OGD exposed cultures treated with boldine during 2h before OGD, during OGD exposure and in the recovery period (24h); 4) treatment 2- OGD exposed cultures treated with boldine during OGD exposure and during the recovery period; 5) treatment 3- OGD exposed cultures treated with boldine only during the recovery period and 6) treatment 4- OGD exposed cultures treated with boldine only during OGD exposure.

Quantification of cell death

Cell damage was assessed by fluorescent image analysis of propidium iodide (PI) uptake [21]. After a recovery period of 23 h, 5 μ M PI (Sigma Chemical) was added to the culture medium and incubated for 1 h. PI uptake is indicative of significant membrane injury [22]. Cultures were observed with an inverted microscope (Nikon Eclipse TE 300) using a standard rhodamine filter set. Images were captured and then analyzed using Scion Image software (<http://www.scioncorp.com>). The area where PI fluorescence was detectable above background was determined using the “density slice” option of Scion Image software and compared to the total hippocampus area to obtain the percentage of damage [23].

Western blotting assay

To investigate the phosphorylation status and immunoccontent of Akt and GSK-3 β the slices were homogenized in lysis buffer (4% sodium dodecylsulfate

(SDS), 2.1 mM EDTA, and 50 mM Tris) 24 h after OGD. Aliquots were taken for protein determination [24] and β -mercaptoethanol (Sigma Chemical) was added to a final concentration of 5%. Proteins were separated (30 μ g per lane) on 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (Sigma Chemical). After electrophoresis, proteins were electrotransferred to nitrocellulose membranes using a semi-dry apparatus (Bio-Rad Trans-Blot SD, Hercules, CA, USA). Membranes were incubated for 60 min at 4°C in blocking solution (Tris-buffered saline containing 5% powdered milk and 0.1% Tween-20) and further incubated with the primary antibody diluted in blocking solution overnight at 4°C. The primary antibodies used were anti-phospho Akt (1:1000; Cell Signaling Technology), anti-Akt (1:1000; Cell Signaling Technology), anti-phospho GSK-3 β (1:1000; Cell Signaling Technology) and anti-GSK-3 β (1:1000; Cell Signaling Technology). The membranes were 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 the percentage of band intensity was analyzed using Optiquant software (Packard Instrument). For each experiment, the test groups were referred to vehicle treated control cultures not exposed to OGD, which were considered 100%, thus assuring the same signal intensity for control and test groups. The test groups were treated with boldine concentration of 250 μ M during OGD period. The data are expressed as percentage of phosphorylated protein, which was obtained by the ratio of the immunoccontent of phosphoprotein (pAkt or pGSK-3 β) to the whole amount of the

protein (Akt or GSK-3 β) provided by the immunodetection assay with the total antibodies.

Isolectin B4 binding to detect microglial cells

In the same way as described above, proteins were resolved (75 μ g per lane) on 8% SDS-PAGE and, after electrophoresis, they were electrotransferred to nitrocellulose membranes using a semi-dry transfer apparatus. Membranes were incubated overnight at 4°C in albumin solution (5% albumin and 2% Tween in PBS, pH 7.4). Isolectin B4 peroxidase conjugated (Sigma) was incubated in PBS containing 0,05% Tween overnight in a final concentration of 0.125 μ g/mL. The chemiluminescence (ECL, Amersham Pharmacia Biotech) was detected using X-ray films that were scanned and analyzed using the Optiquant software (Packard Instruments). The test groups were treated with boldine concentration of 250 μ M only during OGD period and recovered for 24 h. LPS 2 μ g/ml was incubated for 24 h in organotypic hippocampal cultures to be used as a positive control.

Reactive species measurement

After 14 days in culture, hippocampal slices were washed with HBSS pH 7.4, carefully removed from the culture membrane and placed in 96-well black plates (one slice per well) containing control or conditioned medium with 30 μ M DCF-DA (2,7-dihydrodichlorofluorescein diacetate). Slices were incubated at 37°C in the dark for 30 minutes. This fluorophore diffuses through cell membrane and is subsequently enzymatically deacetylated by intracellular esterases to the non-fluorescent DCF-H. Some oxidizing molecules as peroxynitrite, nitric oxide and

hydrogen peroxide have been reported to convert DCF-H to the highly fluorescent DCF [25]. After the time of incubation, the intensity of DCF fluorescence was measured during 120 minutes with an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 535 nm (Hitachi F2000 Fluorescence Spectrophotometer, Japan). Again, the test groups were treated with boldine concentration of 250 μ M only during OGD period and recovered for 24 h.

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm SEM and analyzed for statistical significance by one-way analysis of variance (ANOVA) using a post hoc Tukey test for multiple comparisons. Differences between mean values were considered significant when $p < 0.05$.

Results

Boldine protects against cell death induced by OGD

The exposure of the cultures to 60 min of OGD followed by 24 h of recovery caused a marked fluorescence in the hippocampus, indicating a high incorporation of PI, as presented in the photomicrograph in Fig. 1A (OGD group). Quantification of PI fluorescence showed that OGD caused about 36% of damage in hippocampus, a significant increase compared to control cultures with a basal hippocampus damage of 2% (Fig. 1B). Treatment with 120 and 250 μ M of boldine significantly reduced the injury in the hippocampus to 20 and 11% respectively (Fig. 1B). Once boldine in a concentration of 250 μ M caused a 70% decrease in

cell death we chose this concentration to perform the next experiments. No toxic effect was observed when cultures were treated with boldine in all concentrations tested (Fig. 1B).

Neuroprotective effect of boldine occurs during the OGD period

When boldine (250 μ M) was added before, during OGD exposure and during the recovery period (treatment 1), during OGD exposure and during the recovery period (treatment 2) or only during OGD exposure (treatment 4), we observed a strong decrease in PI uptake indicating that boldine prevent the cell death observed in OGD exposed cultures. This decrease was from 38% of cell damage observed in OGD exposed cultures to 13% in cultures treated only during OGD or 14% in cultures treated before, during OGD and in recovery period or to 12% in cultures treated with boldine during OGD and in recovery period. However when boldine was added only during the recovery period, it was not able to prevent the cell damage (figure 2 A and B). These results suggest that boldine neuroprotective effect mainly occurs if the drug is present during the OGD period.

Boldine induces microglial activation in organotypic cultures

Isolectin B₄ binding was analyzed 24 hours after OGD. Treatment of organotypic cultures with boldine 250 μ M during the 60 min of OGD exposure induced a large increase in isolectin B₄ binding in organotypic hippocampal cultures samples, indicating an induction of microglial activation. This effect occurred in both OGD and control groups, suggesting that this concentration of

boldine has a potent effect in activating the primary immune response. LPS 2 µg/mL was used as a positive control (Fig. 3).

Boldine induces reactive species generation in organotypic hippocampal cultures

Reactive species generation in organotypic cultures was investigated using the cell permeable fluorogenic compound DCF-DA immediately after OGD exposure. Treatment with Boldine 250 µM during 60 min induced an increase in generation of reactive species in organotypic hippocampal cultures at the same level as the exposure to 60 min of OGD, indicating a pro-oxidant effect of the compound in this concentration. Reactive species levels were not decreased or increased when boldine treatment and OGD were combined (Fig. 4).

Neuroprotection induced by boldine treatment is not dependent on Akt and GSK-3β phosphorylation

To investigate the involvement of PI3K pathway on the neuroprotective effect of boldine, we examined the phosphorylation status of Akt and GSK-3β, two downstream proteins of this pathway that are important effectors on cell survival. As we can see in figures 5 and 6, there were no statistical differences in the phosphorylation status of these proteins among any of the groups, suggesting that both proteins are not involved in boldine's effects observed in this work.

Discussion

Ischemic stroke is one of the major causes of mortality in adults and thrombolytic therapy, the only treatment used at the moment, is effective in a very small percentage of patients [26]. The participation of free radical-mediated oxidative events in the initiation and/or progression of neurodegenerative disorders growing up in last years and the research focusing the potential neuroprotective effect of antioxidant molecules became an important strategy for develop new alternatives for the treatment of these diseases. Many groups had shown that boldine, an aporphine-like alkaloid, is one of the most potent natural antioxidants, and it is well characterized some of the pharmacological properties that may arise from the free radical-scavenging properties of boldine [6, 12]. In previous work in our lab, 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. 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 [27]. Here, we investigated the effect of the treatment with boldine against cell death caused by oxygen and glucose deprivation in organotypic hippocampal slices cultures, a model extensively used by our group to mimic ischemic conditions [3, 4, 5, 23, 28].

Propidium iodide uptake was used to evaluate cell death. Using this model, we have shown here that boldine at concentrations of 120 and 250 μM was able to protect organotypic hippocampal against cell death induced by OGD. None of these concentrations show toxic effect in basal conditions, confirming our

prior laboratory results [27]. This is the first report showing a neuroprotective effect of boldine in an ischemic like model.

The treatment done at different periods of time showed that boldine was effective in prevent cell death when the drug was present during OGD exposure, having no effect when boldine was added only after OGD exposure.

In attempt to investigate the mechanisms which could be involved in neuroprotective effect of boldine, first we analyzed microglial activation. For this porpouse, we used isolectin B₄-binding assay, a molecule which is known to bind galactose residues present on microglial cell membrane. Boldine curiously induced activation of microglia by itself, independent if the cultures were exposed or not to OGD. Microglial activation is a process that can worsen the cell death, but that also can protect against the injury, releasing some beneficial factors [29]. It has been shown that microglia protects organotypic hippocampal slice cultures against injury induced by OGD [30]. Apart of this, it was demosntrated the neuroprotective effect of factors released from microglial activation, like IL-6 [31], GDNF, NGF and TGF- β [30]. Another factor, TNF- α , was able to be neuroprotective against excitotoxicity in hippocampus [32], activating antiapoptotic proteins like NF κ B and JNK [33] and stimulating astrocytes to release BDNF [34]. Therefore, we can propose that microglial activation by boldine might be exerting beneficial effects against cell death induced by OGD.

Therefore, we hypothesized that boldine could protect neurons against cell death induced by OGD by its antioxidative properties. We used DCF-DA to evaluate oxidative stress. Despite many studies showing antioxidant effect of boldine [8, 35], our results showed that boldine at concentration of 250 μ M induced

an increase in generation of reactive species in organotypic hippocampal cultures at the same level as exposure to 60 min of OGD, indicating a pro-oxidant effect. It has already been demonstrated that many antioxidants can be pro-oxidants depending of the concentration [36, 37]. Konrath *et al.* [9] have already shown a pro-oxidant effect of 100 μ M of boldine in hippocampal acute slices. Also this increase in oxidative stress could be a consequence of microglial activation or a cause of it. It would be necessary more experiments to clarify these questions.

It is important to note that microglial activation and pro-oxidant effect of boldine did not induce toxicity in cultures that were not exposed to OGD (basal condition). Another important fact is that microglia remains active for 24 hours after the treatment with boldine. If only microglial activation would be the effect by which boldine exerts its neuroprotection, than any exposure to this compound also before the lesion should be protecting cell from death. However, boldine seems not to be neuroprotective when added before OGD, showing that there must be another mechanism that makes boldine extremely necessary during OGD exposure.

Considering our data, we decided investigate if boldine neuroprotective effect could involve some cell signaling pathway. Thus, we studied if boldine is able to alter PI3-K pathway, an important signaling pathway implicated in supporting neuronal survive. For this, we analyzed phosphorylation status of Akt and GSK-3 β , two key proteins of this pathway [18, 38]. There were no statistical differences in the phosphorylation status of these proteins among any of the groups, suggesting that, in the time point we investigated (24 h), PI3-K pathway is not involved in the neuroprotective effect of boldine. However, to be sure that PI3K

is not involved in the neuroprotective effect observed, we might evaluate phosphorylation status of these proteins on shorter periods, like 30 minutes and 6 hours after OGD, because 24 hours after the treatment their status could have returned to the basal levels.

Taken together, our results show for the first time a strong neuroprotective effect of boldine against an ischemic insult. As it was already been demonstrated that boldine is well distributed in the body [39] and it is able to cross blood-brain barrier [40], it is a good candidate to an alternative stroke therapy. However, the mechanism involved in such neuroprotective effect must be clarified and many studies will be necessary for understanding how its effects occur.

Acknowledgments

This research was supported by the Brazilian funding agencies CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico and INCT-EN/CNPq (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Excitotoxicidade e Neuroproteção/CNPq). All the researchers received a CNPq fellowship.

References

[1] Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *TINS*. 22:391-397

- [2] Lipton P (1999) Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol. Rev.* 79:1431-1568.
- [3] Cimarosti H, Rodnight R, Tavares A et al. (2001) An investigation of neuroprotective effect of lithium in organotypic slice cultures of rat hippocampus exposed to oxygen and glucose deprivation. *Neurosci. Lett.* 315:33-36
- [4] Zamin LL, Dillenburg-Pilla P, Argenta-Comiran R et al. (2006) Protective effect of resveratrol against oxygen–glucose deprivation in organotypic hippocampal slice cultures: Involvement of PI3-K pathway. *Neurobiol. Dis.* 24:170-182
- [5] Horn AP, Frozza RL, Grudzinski PB et al. (2009) Conditioned medium from mesenchymal stem cells induces cell death in organotypic cultures of rat hippocampus and aggravates lesion in a model of oxygen and glucose deprivation. *Neurosci. Res.* 63:35-41
- [6] O'Brien P, Carrasco-Pozo C, Speisky H (2005) Boldine and its antioxidant or health-promoting properties. *Chem. Biol. Interact.* 159:1-17
- [7] Speisky H, Cassels BK (1994) Boldo and boldine: an emerging case of natural drug development. *Pharmacol. Res.* 29:1-12
- [8] Youn YC, Kwon OS, Han, ES et al. (2002) Protective effect of boldine on dopamine-induced membrane permeability transition in brain mitochondria and viability loss in PC12 cells. *Biochem. Pharmacol.* 63:495-505
- [9] Konrath EL, Santim K, Nassif M et al. (2008) Antioxidant and pro-oxidant properties of boldine on hippocampal slices exposed to oxygen-glucose deprivation in vitro. *Neurotoxicology.* 29:1136-1140

- [10]** Zetler G (1988) Neuroleptic-like, anticonvulsant and antinociceptive effects of aporphine alkaloids: bulbocapnine, corytuberine, boldine and glaucine. Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 296:255–281
- [11]** Backhouse N, Delporte C, Givernau M et al. (1994) Anti-inflammatory and antipyretic effects of boldine. Agents Actions. 42:114-117
- [12]** Santanam N, Penumetcha M, Speisky H et al. (2004) A novel alkaloid antioxidant, boldine and synthetic antioxidant, reduced form of RU486, inhibit the oxidation of LDL in vitro and atherosclerosis in vivo in LDLR^{-/-} mice. Atherosclerosis. 173:203-210
- [13]** Almeida ER, Melo AM, Xavier H (2000) Toxicological evaluation of the hydro-alcohol extract of the dry leaves of *Peumus boldus* and boldine in rats. Phytother. Res. 14:99-102
- [14]** Polazzi E, Gianni T, Contestabile A (2001) Microglial cells protect cerebellar granule neurons from apoptosis: evidence for reciprocal signaling. Glia. 36:271-280
- [15]** Morgan SC, Taylor DL, Pocock JM (2004) Microglia release activators of neuronal proliferation mediated by activation of mitogen-activated protein kinase, phosphatidylinositol-3-kinase/Akt and d-Notch signalling cascades. J. Neurochem. 90:89-101
- [16]** Koutsilieri E, Scheller C, Tribl F et al. (2002) Degeneration of neuronal cells due to oxidative stress – microglial contribution. Parkinsonism Relat. Disord. 8:401-406
- [17]** Song G, Ouyang G, Bao S (2005) The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. J. Cell. Mol. Med. 9:59-71

- [18]** Pap M, Cooper GM (1998) Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt cell survival pathway. *J. Biol. Chem.* 273:19929-19932
- [19]** Stoppini L, Buchs PA, Muller D (1991) A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J. Neurosci. Methods.* 37:173-182
- [20]** Strasser U, Fischer G (1995) Quantitative measurement of neuronal degeneration in organotypic hippocampal cultures after combined oxygen/glucose deprivation. *J. Neurosci. Methods.* 57:177–186
- [21]** Noraberg J, Kristensen BW, Zimmer J (1999) Markers for neuronal degeneration in organotypic slice cultures. *Brain Res. Protoc.* 3:278–290
- [22]** Macklis JD, Madison RD (1990) Progressive incorporation of propidium iodide in cultured mouse neurons correlates with declining electrophysiological status: a fluorescence scale of membrane integrity. *J. Neurosci. Methods.* 31:43–46
- [23]** Valentim LM, Rodnight R, Geyer AB et al. (2003) Changes in heat shock protein 27 phosphorylation and immunoccontent in response to preconditioning to oxygen and glucose deprivation in organotypic hippocampal cultures. *Neuroscience.* 118:379–386
- [24]** Peterson GL (1983) Determination of total protein. *Methods Enzymol.* 91:95–119
- [25]** Possel H, Noack H, Augustin W et al. (1997) 2,7-Dihydrodichlorofluorescein diacetate as a fluorescent marker for peroxynitrite formation. *FEBS Lett.* 416:175-178
- [26]** Atkinson RP, Delemos C (2000) Acute ischemic stroke management. *Thromb. Res.* 98:97-111

- [27] Gerhardt D, Horn AP, Gaelzer MM et al. (in press) Boldine: a potential new antiproliferative drug against glioma cell lines. *Invest. New Drugs*.
- [28] Simão F, Zamin LL, Frozza R et al. (*in press*) Protective profile of oxcarbazepine against oxygen-glucose deprivation in organotypic hippocampal culture could involve PI3K cell signaling pathway. *Neurol. Res*.
- [29] Bessis A, Béchade C, Bernard D et al. (2007) Microglial control of neuronal death and synaptic properties. *Glia*. 55:233–238
- [30] Neumann J, Gunzer M, Gutzeit HO et al. (2006) Microglia provide neuroprotection after ischemia. *FASEB J*. 20:714-716
- [31] Lucas SM, Rothwell NJ, Gibson RM (2006) The role of inflammation in CNS injury and disease. *Br. J. Pharmacol*. 147:232-240
- [32] Gary DS, Bruce-Keller AJ, Kindy MS et al. (1998) Ischemic and excitotoxic brain injury is enhanced in mice lacking the p55 tumor necrosis factor receptor. *J. Cereb. Blood Flow Metab*. 18:1283–1287
- [33] Hallenbeck JM (2002) The many faces of tumor necrosis factor in stroke. *Nat. Med*. 8:1363-1368
- [34] Saha RN, Liu X, Pahan K (2006) Up-regulation of BDNF in Astrocytes by TNF- α : A case for the neuroprotective role of cytokine. *J. Neuroimmune Pharmacol*. 1:212-222
- [35] Jang YY, Song JH, Shin YK et al. (2000) Protective effect of boldine on oxidative mitochondrial damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmacol. Res*. 42:361-371
- [36] Atanassova BD, Tzatchev KN Ascorbic acid--important for iron metabolism. *Folia Med. (Plovdiv)* 50:11-16

[37] Hajiani M, Golestani A, Sharifabrizi A (2008) Dose-dependent modulation of systemic lipid peroxidation and activity of anti-oxidant enzymes by vitamin E in the rat. *Redox Rep.* 13:60-66

[38] Datta SR, Brunet A, Greenberg ME (2000) Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev.* 13:2905-2927

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

[40] Loghin F, Chagraoui A, Asencio M et al. (2003) 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

Legends to the figures

Fig. 1 Effect of boldine on cell damage induced by OGD for 60 min in organotypic hippocampal cultures. (A) Representative photomicrographs of slices stained with PI after 24 h after exposure to OGD. (B) Quantitative analysis of hippocampal damage 24 h after exposure to OGD. Boldine (60, 120 and 250 μ M) was added 2 hours before the start of the OGD and was maintained during the lesion induction and during the recovery period. Bars represent the mean \pm SEM, n=9. * Significantly different from OGD cultures (one-way ANOVA followed by Tukey, $p<0.05$).

Fig. 2 Effect of treatment with 250 μ M of boldine at different periods of time on cell damage induced by OGD for 60 min in organotypic hippocampal cultures. (A) Representative photomicrographs of slices stained with PI after 24 h after exposure to OGD. (B) Quantitative analysis of hippocampal damage 24 h after exposure to OGD. Treatment 1: Boldine was added 2 hours before the start of the OGD and was maintained during the lesion induction and during the recovery period. Treatment 2: Boldine was added at the start of the OGD and maintained during the recovery period. Treatment 3: boldine was added during the recovery period. Treatment 4: boldine was added only during the OGD period. Bars represent the mean \pm SEM, n=9. * Significantly different from OGD cultures (one-way ANOVA followed by Tukey, $p<0.05$).

Fig. 3 Isolectin B₄ reactivity in organotypic hippocampal cultures after 24 h of boldine and OGD exposure. LPS 2 μ g/ml was used as a positive control, n=5 animals.

Fig. 4 Boldine induces reactive species generation in organotypic hippocampal cultures. (A) Formation of reactive species during 2 hours after OGD and treatment with boldine. (B) Quantification of the velocity of DCF-DA oxidation in slices during the first 2 hours after OGD. Bars represent the mean \pm SEM, n=3. * Significantly different from control cultures (one-way ANOVA followed by Tukey, $p < 0.05$).

Fig. 5 Effect of treatment with boldine on the percentage of phosphorylated Akt in organotypic hippocampal cultures. (A) Representative Western blottings of phosphoAkt and Akt 24 h after OGD revealed using specific antibodies. (B) Histograms represent the quantitative Western blotting analysis of Akt phosphorylation state (ratio phosphoAkt/Akt). The densitometric values obtained to phospho-Akt and Akt were first normalized to control group (100%). Bars represent the mean \pm SEM, n=6.

Fig. 6 Effect of treatment with boldine on the percentage of phosphorylated GSK-3 β in organotypic hippocampal cultures. (A) Representative Western blottings of phosphoGSK-3 β and GSK-3 β 24 h after OGD revealed using specific antibodies. (B) Histograms represent the quantitative Western blotting analysis of GSK-3 β phosphorylation state (ratio phosphoGSK-3 β /GSK-3 β). The densitometric values obtained to phospho-GSK-3 β and GSK-3 β were first normalized to control group (100%). Bars represent the mean \pm SEM, n=6.

Figure 1

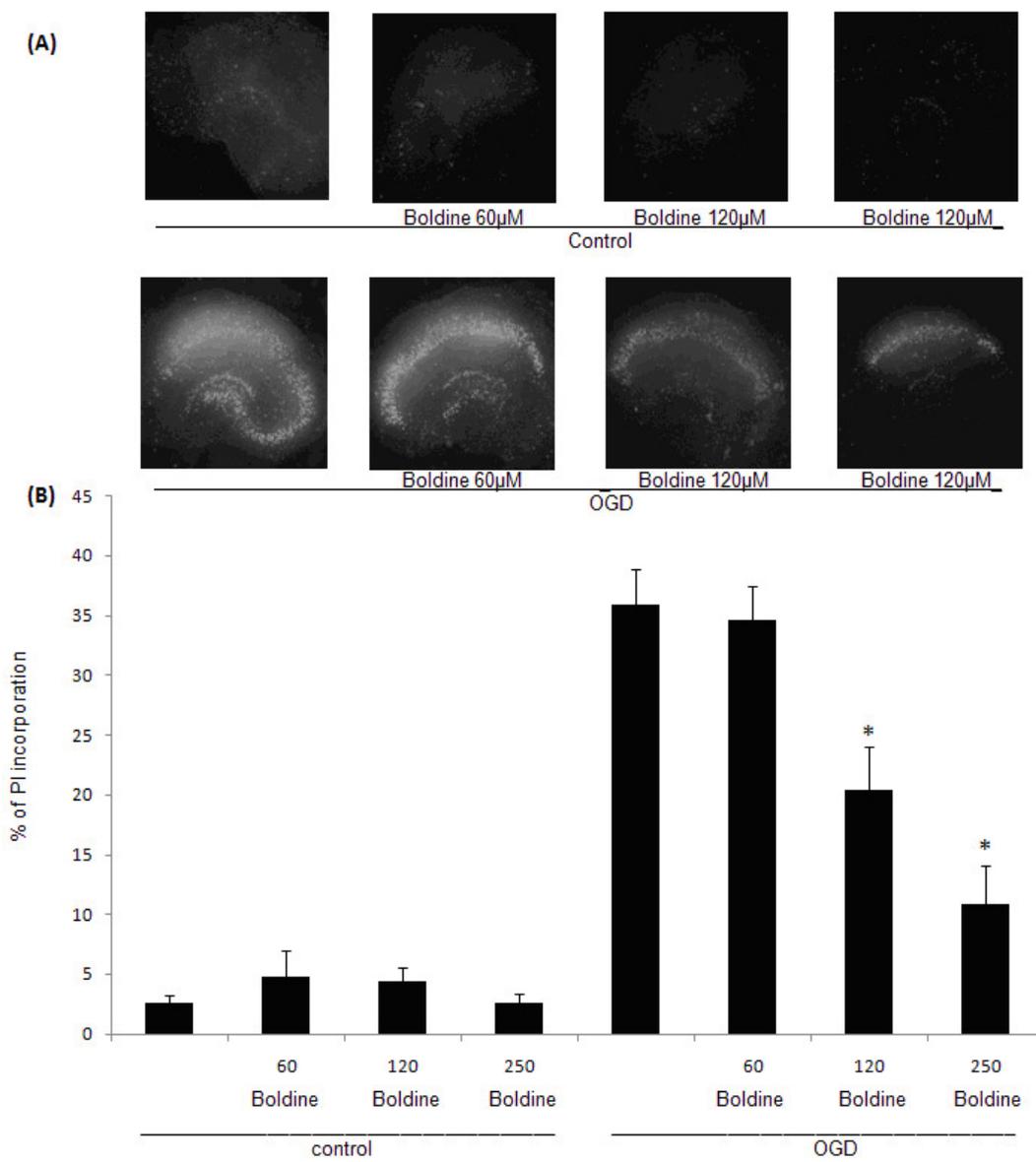


Figure 2

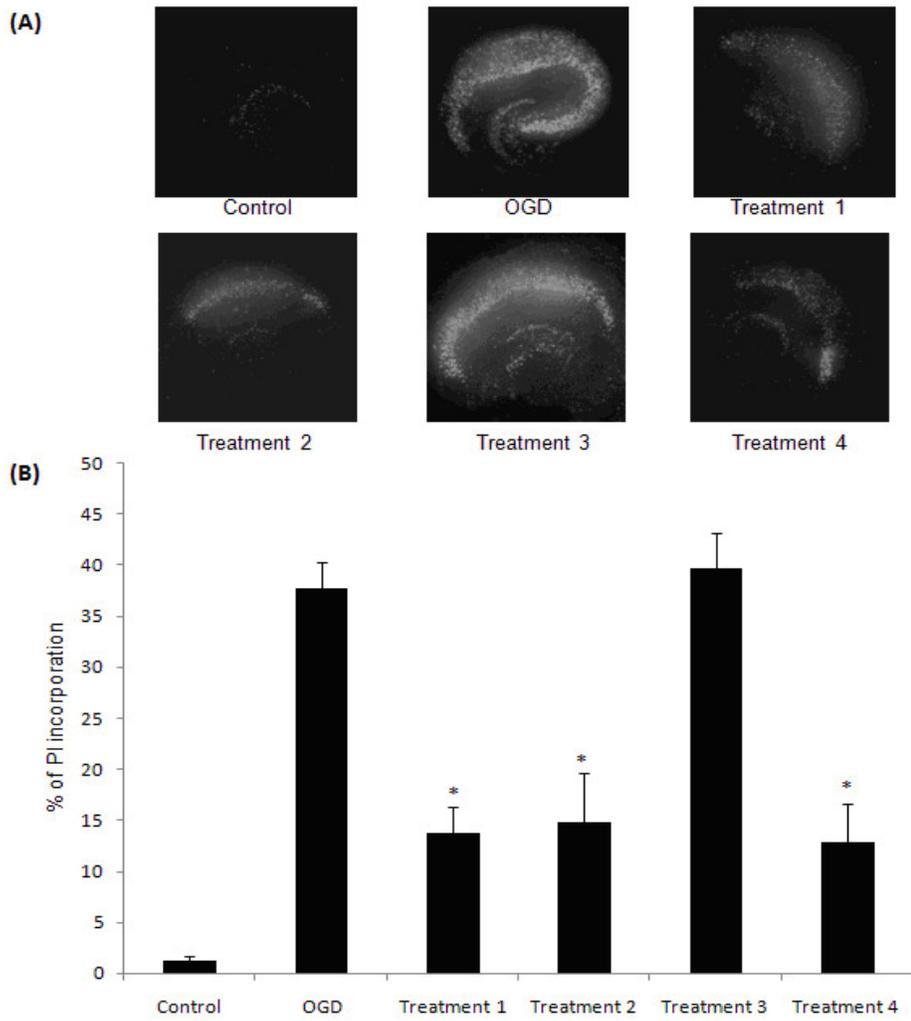


Figure 3

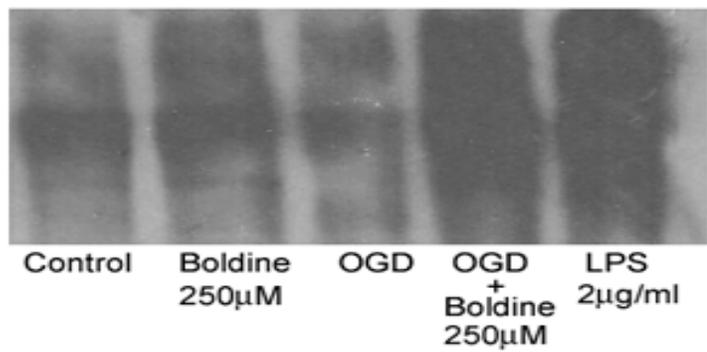


Figure 4

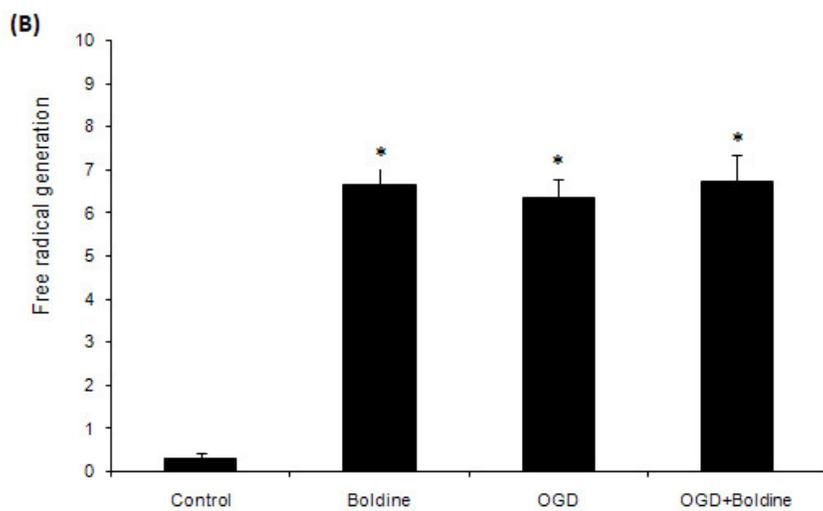
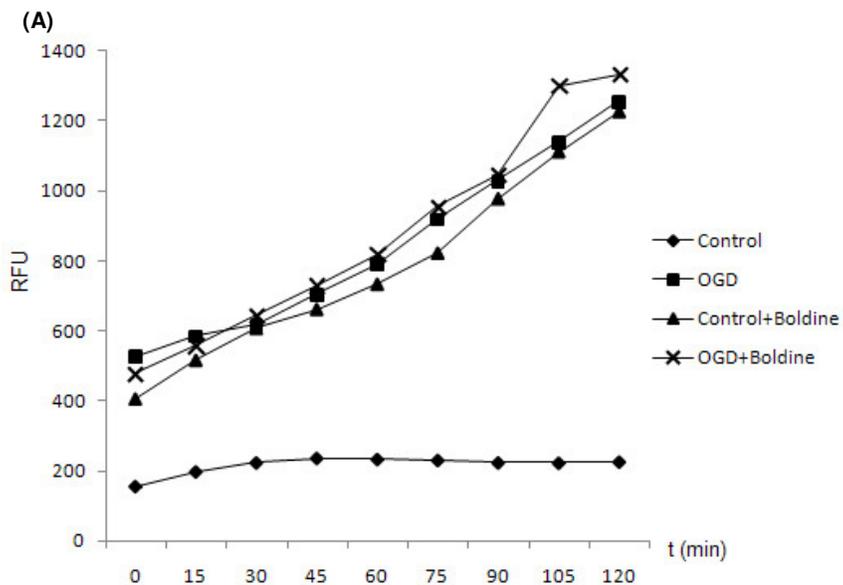


Figure 5

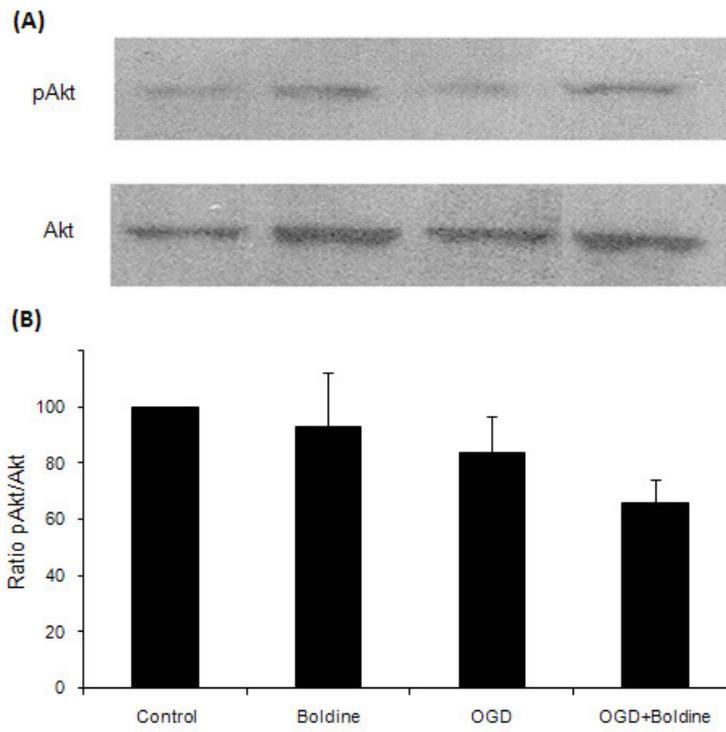
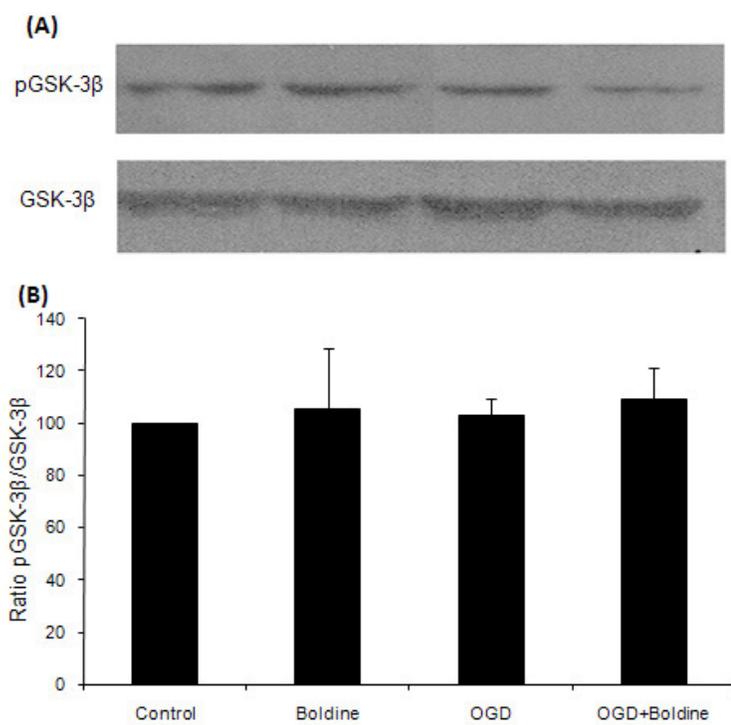


Figure 6



5. DISCUSSÃO

Com o aumento da expectativa de vida, tem sido observado um conseqüente aumento na incidência e no progresso de doenças neurodegenerativas. A incidência de eventos isquêmicos cerebrais em humanos tende a aumentar com o avanço da idade, e estima-se que atualmente esta seja uma das principais causas de morte entre adultos em países desenvolvidos, além de poder gerar incapacidade física ou mental permanente nos indivíduos afetados (Lotufo, 2005; American Heart Association, 2008). O tratamento atual com o agente trombolítico alteplase é possível de ser utilizado em uma porcentagem muito pequena de pacientes, o que nos encoraja a estudar novas estratégias terapêuticas (Atkinson & DeLemos, 2000, American Stroke Association, 2008).

Nesse sentido, os estudos *in vitro* através do cultivo de tecidos e células são bastante utilizados para a avaliação de processos neurodegenerativos e investigação do efeito de fármacos com potencial efeito neuroprotetor. Os ensaios *in vitro* têm como vantagens a redução do número de animais por experimento, um maior controle sobre os inúmeros fatores que podem influenciar nos resultados e a maior facilidade em se avaliar os mecanismos de ação para determinado efeito a nível celular e molecular (Gebhardt, 2000). O modelo de privação de oxigênio e glicose, mimetizando as condições isquêmicas, já foi validado e é rotineiramente utilizado por nosso grupo para a investigação de novos agentes terapêuticos visando a neuroproteção (Valentim *et al.*, 2003; Cimarosti *et al.*, 2005; Horn *et al.*, 2005; Zamin *et al.*, 2006; Horn, *et al.*, 2009; Simão *et al.*, *in press*).

O uso dos mais diversos tipos de preparações contendo produtos vegetais para fins medicinais é tradicional desde os tempos mais remotos. Entre os metabólitos isolados de plantas, os alcalóides possuem uma grande diversidade estrutural e um amplo espectro de atividades biológicas, fazendo deles um grupo de importante interesse terapêutico (Bruneton, 1991). Muitos trabalhos têm demonstrado que o alcalóide boldina possui efeitos em sistemas biológicos (Youn *et al.*, 2002, Santanam *et al.*, 2004, O'Brien *et al.*, 2005, Gerhardt *et al.*, *in press*).

Entretanto, o tratamento com boldina contra os danos causados por condições isquêmicas ainda possui poucos estudos. Portanto, nesse trabalho, tivemos como objetivo geral, testar o efeito da boldina sobre a morte celular induzida pela privação de oxigênio e glicose em culturas organotípicas de hipocampo de rato, bem como investigar possíveis mecanismos de ação envolvidos no efeito neuroprotetor observado.

Como primeiro passo, realizamos uma curva de concentrações de boldina e avaliamos a morte celular através da incorporação do corante iodeto de propídio (IP). O IP é uma molécula que é excluída de células saudáveis e só é capaz de permear células com a membrana rompida, onde ele é capaz de intercalar-se ao DNA, gerando fluorescência frente à luz UV, sendo um bom indicativo de dano celular (Macklis & Madison, 1990). Em um trabalho anterior em nosso laboratório, demonstramos que a boldina apresenta toxicidade na concentração de 500 μM em culturas organotípicas de hipocampo sob condições basais (Gerhardt *et al.*, *in press*). Por isso, nesse trabalho, utilizamos apenas a faixa de concentrações de 60, 120 e 250 μM . A boldina foi colocada 2 horas antes da exposição das culturas à POG e mantida durante a exposição e durante o período de recuperação de 24 horas. Os tratamentos com 120 e 250 μM de boldina foram capazes de diminuir significativamente a incorporação de IP causada pela POG, demonstrando um forte efeito neuroprotetor. Em condições basais, nenhuma das concentrações testadas aumentou a incorporação de IP, confirmando os resultados anteriores do nosso laboratório. O tratamento com concentração de 250 μM de boldina foi o que causou a maior redução na morte celular após a POG (em torno de 70%) sem ter sido tóxico nas fatias de hipocampo em condições basais, tendo sido o escolhido a ser utilizado para fazer a curva de tempo e os demais experimentos.

Na sequência, testamos o tratamento em diferentes tempos para verificar em qual momento a boldina é necessária para exercer o seu efeito neuroprotetor. Com isso, demonstramos que a boldina é neuroprotetora apenas quando adicionada durante o período de 1 hora de POG, não demonstrando nenhuma atividade significativa quando presente somente durante as 24 horas de recuperação. Essa característica torna a boldina muito mais útil como uma

profilaxia para a isquemia cerebral do que como um tratamento propriamente dito que seria utilizado após o evento isquêmico. A partir das duas curvas, a de concentração e a de tempo, pôde-se fixar um tratamento para os próximos experimentos, mantendo sempre a concentração de 250 μ M adicionada apenas durante a POG.

Conforme apresentado na introdução (figura 1), diversos eventos estão envolvidos com a morte isquêmica, como o aumento do cálcio intracelular, a excitotoxicidade, a neuroinflamação e o estresse oxidativo (Wahlgren & Ahmed, 2004). Diante dos resultados obtidos, mostrando uma efetiva ação neuroprotetora da boldina, passamos a investigar o possível mecanismo de ação envolvido. Dentre os múltiplos alvos elegemos a análise da ativação microglial, como parâmetro de envolvimento da neuroinflamação, a produção de espécies reativas, uma vez que a boldina tem ação antioxidante já bem caracterizada, e a via de sinalização da PI3K, em particular as proteínas Akt e GSK-3 β .

As células da microglia são as principais responsáveis pela resposta inflamatória no Sistema Nervoso Central (Sriram & O'Callaghan, 2007). Para verificar a ativação de microglia, utilizamos marcação por isolectina B₄, molécula bastante utilizada na literatura para identificação de microglia por marcar resíduos de galactose presentes apenas na membrana dessas células (Hailer *et al.*, 2005; Buffo *et al.*, 2008). A boldina causou indução da ativação de microglia tanto nas fatias em condições basais, como nas submetidas à POG. Como já mencionado, a ativação microglial e a neuroinflamação possuem duas faces, podendo agravar o dano celular ou proteger as células contra esse dano, como acreditamos que possa ter ocorrido no caso do tratamento com boldina. A ocorrência de um ou de outro desses efeitos antagônicos depende dos fatores secretados pela microglia, de suas concentrações, dos receptores ativados por eles, da região cerebral e da interação entre a microglia e outros tipos celulares, como neurônios e astrócitos (Zietlow, 1999; Polazzi, 2001; Bessis, 2007). Já foi demonstrado em um trabalho de Neumann e colaboradores (2006) que a microglia protege os neurônios contra os danos causados pela POG em culturas organotípicas de hipocampo. Outro estudo com administração de IL-6 recombinante resultou em redução no dano

isquêmico, sugerindo que a IL-6 pode inibir a morte neuronal durante a isquemia cerebral (Lucas *et al.*, 2006). Também já foi demonstrado o efeito neuroprotetor de TNF- α , outro fator secretado pelas células gliais, contra a excitotoxicidade em hipocampo, sendo que ratos *knockout* para os receptores de TNF apresentam dano aumentado após uma isquemia cerebral (Bruce *et al.*, 1996; Gary *et al.*, 1998). A ativação por TNF- α do receptor TNFR1 causa a ativação de diferentes vias de sinalização, podendo levar à ativação das proteínas NF κ B e JNK, que resultam em sobrevivência celular e tolerância à isquemia (Hallenbeck, 2002). Além disso, os astrócitos podem secretar o fator trófico BDNF em uma via dependente de TNF- α que parece envolver as proteínas NF κ B e ERK (Saha *et al.*, 2006). Outros mecanismos pelos quais o TNF- α parece exercer seus efeitos incluem a ativação de processos de reparo pela microvasculatura cerebral, estímulo da plasticidade neuronal, indução do fator antiapoptótico Bcl-2 e regulação do cálcio extracelular e da proteína ligante de cálcio calbindina-D28K (Sriram & O'Callaghan, 2007). A microglia ainda secreta fatores neurotróficos que também podem ser responsáveis por efeitos benéficos aos neurônios, como GDNF, NGF e TGF- β (Neumann *et al.*, 2006). O TGF- β 1 produzido parece promover o reparo tecidual por reduzir a formação da cicatriz astrogliosa (Kreutzberg, 1996).

Para avaliar uma atividade anti ou pró-oxidante da boldina, medimos a produção de espécies reativas pelas culturas utilizando o fluoróforo DCF-DA. Esta molécula é desacetilada no interior das células e oxidada por espécies reativas à molécula fluorescente DCF, sendo então a fluorescência medida proporcional à concentração de espécies reativas no meio (Possel *et al.*, 1997). Apesar de muitos trabalhos já terem demonstrado um efeito antioxidante da boldina (Cederbaum *et al.*, 1992; Jang *et al.*, 2000; Youn *et al.*, 2002), nossos resultados mostraram efeito pró-oxidante da boldina na concentração de 250 μ M. Já se sabe que diversas moléculas antioxidantes também podem agir como pró-oxidantes dependendo da sua concentração (Cao *et al.*, 1997; Atanassova & Tatchev, 2008; Hajiani *et al.*, 2008). Além disso, já foi demonstrado em nosso grupo um efeito pró-oxidante da boldina na concentração de 100 μ M em fatias agudas de hipocampo (Konrath *et al.*, 2008). Em nosso modelo experimental, é provável que

o aumento na geração de espécies reativas seja causado pela ativação rápida da microglia. Entretanto, o contrário também pode ser possível, visto que o estresse oxidativo também pode ser o causador da ativação da microglia (Min *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2008). Portanto, não é possível concluir o que é causa e o que é efeito nesse caso, podendo inclusive haver um ciclo de retroalimentação com um processo influenciando o outro. É importante salientar que apesar de a boldina ter induzido ativação microglial e ter apresentado ação pró-oxidante, esses efeitos não foram causadores de toxicidade, uma vez que não foi observada morte celular, avaliada pela incorporação de iodeto de propídeo, em nenhum dos controles testados.

Partimos para a investigação do possível envolvimento de vias de sinalização relacionadas com a sobrevivência celular. A via de sinalização da PI3-K possui um papel importante na morte e na sobrevivência celular e é possível avaliar a sua ativação através da medida do estado de fosforilação de duas proteínas centrais: a Akt e a GSK-3 β (Pap & Cooper, 1998; Datta *et al.*, 1999). Não foi observada modificação na fosforilação dessas proteínas 24 horas após o tratamento com boldina, sugerindo que esta via possa não estar envolvida com o efeito neuroprotetor observado. Dados da literatura já demonstraram que, embora ocorram alterações na fosforilação da Akt após a POG, o seu estado de ativação costuma voltar aos níveis basais após as 24 horas de recuperação (Janelidze *et al.*, 2001; Kitagawa *et al.*, 2002). Do mesmo modo, modificações causadas pela boldina poderiam estar ocorrendo precocemente, e uma vez que só foram feitas medidas 24 horas após o tratamento, estas não seriam detectadas. Portanto, como perspectiva de continuação desse trabalho, pretende-se avaliar os níveis de fosforilação das proteínas Akt e GSK-3 β em tempos menores, como 30 minutos e 6 horas após o tratamento.

Além dos dados apresentados nesse trabalho, que demonstram um forte efeito neuroprotetor, outras características que tornam a boldina atrativa para a terapêutica são a sua capacidade de ser bem distribuída pela circulação sistêmica (Jimenez & Speisky, 2000) e de atravessar a barreira hemato-encefálica (Loghin *et al.*, 2003).

Com base nos nossos resultados, concluímos que a boldina possui um potencial efeito neuroprotetor contra os danos causados pela isquemia cerebral, sendo uma forte candidata para o desenvolvimento de fármacos que sirvam como alternativa ao tratamento atual ou como profilaxia para essa patologia. Entretanto, pouco sobre o mecanismo de ação da boldina pode ser concluído e, portanto, muito estudo ainda é necessário até que possamos compreender como ocorre o seu efeito. Além disso, estudos *in vivo* se fazem necessários para averiguar se o efeito protetor se mantém, assim como para avaliar a melhor via de administração e possíveis efeitos colaterais em outros sistemas do organismo.

6. CONCLUSÕES

1. A boldina nas concentrações de 100 μM e 250 μM foi capaz de reduzir significativamente a morte celular após a privação de oxigênio e glicose em culturas organotípicas de hipocampo de rato.

2. A boldina não apresentou toxicidade em nenhuma das concentrações testadas.

3. O efeito neuroprotetor da boldina ocorre quando ela está presente durante o período de privação de oxigênio e glicose.

4. O tratamento com boldina 250 μM induziu ativação microglial, observada 24 horas após o tratamento.

5. O tratamento com boldina 250 μM causou um aumento na produção de espécies reativas na mesma intensidade da privação de oxigênio e glicose. Esse aumento pode ser consequência da produção destas espécies pela microglia ativada.

6. As proteínas Akt e GSK-3 β não alteram seu status de fosforilação 24 horas após o tratamento com boldina na concentração de 250 μM ou após a privação de oxigênio e glicose.

7. PERSPECTIVAS

1. Utilizar tratamento concomitante de boldina com antioxidantes ou antiinflamatórios para analisar se a neuroproteção está envolvida com a ativação microglial.
2. Avaliar a ativação astrocitária após o tratamento com boldina através da imunoquantificação da proteína GFAP.
3. Avaliar a fosforilação das proteínas Akt e GSK-3 β nos tempos de 30 minutos e 6 horas após o tratamento com boldina.
4. Avaliar o envolvimento de outras vias de sinalização celular, através da avaliação das proteínas ERK, JNK e NF κ B.
5. Utilizar o tratamento com boldina *in vivo* no modelo de isquemia global para avaliar se a neuroproteção que ocorre no modelo *in vitro* se mantém.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, E. R.; MELO, A. M.; XAVIER, H. Toxicological evaluation of the hydro-alcohol extract of the dry leaves of *Peumus boldus* and boldine in rats. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 99-102, 2000.

American Heart Association. **Heart Disease and Stroke Statistics** — 2008 Update, 2008.

American Stroke Association, **www.strokeassociation.org**, acesso em 19 de outubro de 2008.

ATANASSOVA, B. D.; TZATCHEV, K. N. Ascorbic acid--important for iron metabolism. **Folia Medica (Plovdiv)**, v. 50, p. 11-16, 2008.

ATKINSON, R. P., DELEMOS, C. Acute ischemic stroke management. **Thrombosis Research**, v. 98, p. 97-111, 2000.

BACKHOUSE, N., DELPORTE, C., GIVERNAU, M., CASSELS, B. K., VALENZUELA, H., SPEISKI, H. Anti-inflammatory and antipyretic effects of boldine, **Agents Actions**, v. 42, p. 114–117, 1994.

BARTUS, R. T., DEAN, R. L., MENNERICK, S., EVELETH, D., LYNCH, G. Temporal ordering of pathogenic events following transient global ischemia. **Brain Research**, v. 790, p.1-13, 1998.

BELHAM, C., WU, S., AVRUCH J. Intracellular Signalling: PDK1 – A kinase at the hub of things. **Current Bioogy**, v. 9, p. 93-96, 1999.

BESSIS, A.; BÉCHADE, C.; BERNARD, D.; ROUMIER, A. Microglial Control of Neuronal Death and Synaptic Properties. **Glia**, v. 55, p. 233–238, 2007.

BRUCE, A. J.; BOLING, W.; KINDY, M. S. PESCHON, J.; KRAENER, P. J.; CARPENTER, M. K.; HOLTSBERG, F. W.; MATTSON, M. P. Altered neuronal

and microglial responses to excitotoxic and ischemic brain injury in mice lacking TNF receptors. **Nature Medicine**, v. 2, p. 788–794, 1996

BRUNET, A., BONNI, A., ZIGMOND, M. J., LIN, M. Z., JUO, P., HU, L. S., ANDERSON, M. J., ARDEN, K. C., BLENIS, J. & GREENBERG, M. E. Akt Promotes Cell Survival by Phosphorylating and Inhibiting a Forkhead Transcription Factor. **Cell**, v. 96, p. 857-868, 1999.

BRUNETON, J. Alcaloïdes. In: BRUNETON, J. **Eléments de Phytochimie et de Pharmacognosie**. Zaragoza: Acribia, 2^a ed, 594 p., 1991.

BUFFO, A.; RITE, I.; TRIPATHI, P.; LEPIER, A.; COLAK, D.; HORN, A. P.; MORI, T.; GÖTZ, M. Origin and progeny of reactive gliosis: a source of multipotent cells in the injured brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 105, p. 3581-3586, 2008.

CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure–activity relationships. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 22, p. 749–60, 1997.

CAO, G.; PEI, W.; LAN, J.; STETLER, R. A.; LUOY, Y.; NAGAYAMA, T.; GRAHAM, S. H.; YIN, X. M.; SIMON, R. P.; CHEN, J. Caspase-activated DNase/DNA fragmentation factor 40 mediates apoptotic DNA fragmentation in transient cerebral ischemia and in neuronal cultures. **Journal of Neuroscience**, v. 21, p. 4678-4690, 2001.

CARDONE, M. H., ROY, N., STENNICKE, H. R., SALVESEN, G. S., FRANKE, T. F., STANBRIDGE, E., FRISCH, S., REED, J. C. Regulation of Cell Death Protease Caspase-9 by Phosphorylation. **Science**, v. 282, p. 1318-1321, 1998.

CEDERBAUM, A. I.; KUKIELKA, E.; SPEISKY, H. Inhibition of rat liver microsomal lipid peroxidation by boldine, **Biochemical Pharmacology** v. 44, p. 1765–1772, 1992.

CIMAROSTI, H., RODNIGHT, R., TAVARES, A., PAIVA, R., VALENTIM, L., ROCHA, E. & SALBEGO, C. An investigation of neuroprotective effect of lithium in

organotypic slice cultures of rat hippocampus exposed to oxygen and glucose deprivation. **Neuroscience Letters**, v. 315, p. 33-36, 2001.

CIMAROSTI, H.; ZAMIN, L. L.; FROZZA, R.; NASSIF, M.; HORN, A. P.; TAVARES, A. A.; NETTO, C. A.; SALBEGO, C. Estradiol protects against oxygen and glucose deprivation in rat hippocampal organotypic cultures and activates Akt and inactivates GSK-3 β . **Neurochemistry Research**, v. 30, p. 191-199, 2005.

COFFER, P. J.; JIN, J.; WOODGETT, J. R. Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. **Biochemical Journal**, v. 335, p. 1-13, 1998.

COHEN, P.; FRAME, S. The renaissance of GSK3. **Nature Reviews**, v. 2, p. 769-776, 2001.

COLBOURNE, F., SUTHERLAND, G. R., & AUER, R. N. Electron Microscopic Evidence against apoptosis as the mechanism of neuronal death in global ischemia. **Journal of Neuroscience**, v. 19, p. 4200-4210, 1999.

COMIRAN, R. A. Acidente Vascular Cerebral Isquêmico: Tratamento Atual e Perspectivas. Trabalho de conclusão do curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

DATTA, S. R., BRUNET, A., & GREENBERG, M. E. Cellular survival: a play in three Akts. **Genes & Development**, v. 13, p. 2905-2927, 1999.

DIRNAGL, U., IADECOLA, C., MOSKOWITZ, M. A. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. **Trends in Neurosciences**, v. 22, p.391-397, 1999.

DU, K.; MONTMINY, M. CREB Is a Regulatory Target for The Protein Kinase Akt/PKB. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 32377-32379, 1998.

DUGAN, L. L.; CHO, D. W. Excitotoxicity, free radicals, and cell membrane changes. **Annals of Neurology**, v. 35, p. S17-21, 1994.

FAROOQUI, A.A.; HAUN, S.E.; HORROCKS, L.A. Ischemia and hypoxia. In: **Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects**. 6th Edition. New York: Raven Press, 1993, 1080 p.

FRANTSEVA, M. V., CARLEN, P. I., VELAZQUEZ, J. L. P. Dynamics of intracellular calcium and free radical production during ischemia in pyramidal neurons. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, p.1216-1227, 2001.

FULTON, D., GRATTON, J-P., MCCABE, T. J., FONTANA, J., FUJIO, Y., WALSH, K., FRANKE, T. F., PAPAPETROPOULOS, A. & SESSA, W. C. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein Kinase Akt. **Nature**, v. 399, p. 597-601, 1999.

GARY, D. S.; BRUCE-KELLER, A. J.; KINDY, M. S.; MATTSON, M. P. Ischemic and excitotoxic brain injury is enhanced in mice lacking the p55 tumor necrosis factor receptor. **Journal of Cerebral Blood Flow Metabolism**, v. 18, p. 1283–1287, 1998.

GEBHARDT, R. *In vitro* screening of plant extracts and phytopharmaceuticals: novel approaches for the elucidation of active compounds and their mechanisms. **Planta medica**, v. 66, p. 99-105, 2000.

GERHARDT, D., HORN, A. P., GAELZER, M. M., FROZZA, R. L., DELGADO-CAÑEDO, A., PELEGRINI, A. L., HENRIQUES, A. T., LENZ, G., SALBEGO, C. Boldine: a potential new antiproliferative drug against glioma cell lines. **Investitional New Drugs**, *in press*.

HAILER, N. P.; VOGT, C.; KORF, H-W; DEHGHANI, F. Interleukin-1 β exacerbates and interleukin-1 receptor antagonist attenuates neuronal injury and microglial activation after excitotoxic damage in organotypic hippocampal slice cultures. **European Journal of Neuroscience**, v. 21, p. 2347-2360, 2005.

HAJIANI, M.; GOLESTANI, A.; SHARIFTABRIZI, A.; RASTEGAR, R.; PAYABVASH, S.; SALMASI, A. H.; DEHPOUR, A. R.; PASALAR, P. Dose-

dependent modulation of systemic lipid peroxidation and activity of anti-oxidant enzymes by vitamin E in the rat. **Redox Report**, v. 13, p. 60-66, 2008.

HALLENBECK, J. M. The many faces of tumor necrosis factor in stroke. **Nature Medicine**, v. 8, p. 1363-1368, 2002.

HEPPNER, F. L.; SKUTELLA, T.; HAILER, N. P.; HAAS, D.; NITSCH, R. Activated microglia migrate towards sites of excitotoxic neuronal injury inside organotypic hippocampal slice cultures. **European Journal of Neuroscience**, v. 110, p. 3284-3290, 1998).

HORN, A. P.; GERHARDT, D.; GEYER, A. B.; VALENTIM, L.; CIMAROSTI, H.; TAVARES, A.; HORN, F.; LENZ, G.; SALBEGO, C. Cellular death in hippocampus in response to PI3-K pathway inhibition and oxygen and glucose deprivation. **Neurochemical Research**, v. 30, p. 355-361, 2005.

HORN, A. P.; FROZZA, R. L.; GRUDZINSKI, P. B.; GERHARDT, D.; HOPPE, J. B.; BRUNO, A. N.; CHAGASTELLES, P.; NARDI, N. B.; LENZ, G.; SALBEGO, C. Conditioned medium from mesenchymal stem cells induces cell death in organotypic cultures of rat hippocampus and aggravates lesion in a model of oxygen and glucose deprivation. **Neuroscience research**. v. 63, p. 35-41, 2009.

JANELIDZE, S.; HU, B.-R.; SIESJÖ, P; SIESJÖ B. K. Alterations of Akt1 (PKB α) and p70^{S6K} in transient focal ischemia. **Neurobiology Disease**, v. 8, p. 147-154, 2001.

JANG, Y. Y.; SONG, J. H.; SHIN, Y. K.; HAN, E. S.; LEE, C. S. Protective effect of boldine on oxidative mitochondrial damage in streptozotocin-induced diabetic rats. **Pharmacological Research**, v. 42, p. 361-371, 2000.

JIMENEZ, I.; SPEISKY, H. Biological disposition of boldine: in vitro and in vivo studies. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 254-260, 2000.

KINGHAM, P. J.; POCOCK, J. M. Microglial secreted cathepsin B induces neuronal apoptosis. **Journal of Neurochemistry**, v. 76, p. 1475-1484, 2001.

KIRINO T. Delayed neuronal death. **Neuropathology** v. 20, p. S95-97, 2000.

KITAGAWA, K.; TAKASAWA, K.; KUWABARA, K.; SASAKI, T.; TANAKA, S.; MABUCHI, T.; SUGIURA, S.; OMURA-MATSUOKA, E.; MATSUMOTO, M.; HORI, M. Differential Akt phosphorylation at Ser473 and Thr308 in cultured neurons after exposure to glutamate in rats. **Neuroscience Letters**, v. 333, p. 187-190, 2002.

KONRATH, E. L.; SANTIM, K.; NASSIF, M.; LATINI, A.; HENRIQUES, A.; SALBEGO, C. Antioxidant and pro-oxidant properties of boldine on hippocampal slices exposed to oxygen-glucose deprivation in vitro. **Neurotoxicology**, v. 29, p. 1136-1140, 2008.

KOUTSILIERI, E.; SCHELLER, C.; TRIBL, F.; RIEDERER, P. Degeneration of neuronal cells due to oxidative stress – microglial contribution. **Parkinsonism Related Disorders**, v. 8, p. 401-406, 2002.

KREUTZBERG, G. W. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. **Trends in Neurosciences**, v. 19, p. 312-318, 1996.

LAAKE, J.H., HAUG, F.M., WIELOCH, T. & OTTERSEN, O.P. A simple in vitro model of ischemia based on hippocampal slice cultures and propidium iodide fluorescence. **Brain Research Protocols**, v. 4, p. 173-184, 1999.

LIPTON, P. Ischemic cell death in brain neurons. **Physiological Reviews**, v. 79, p.1431-1568, 1999.

LOETSCHER, H., NIEDERHAUSER, O., KEMP, J., GILL, R. Is caspase-3 inhibition a valid therapeutic strategy in cerebral ischemia? **Drug Discovery Today**, v. 6, p.671-680, 2001.

LOGHIN, F.; CHAGRAOUI, A.; ASECIO, M.; COMOY, E.; SPEISKY, H.; CASSELS, B. K.; PRPTAIS, P. Effects of some antioxidants aporphine derivatives on striatal dopaminergic transmission and on MPTP-induced striatal dopamine

depletion in B6CBA mice. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 18, p. 133-140, 2003.

LOTUFO, P. A. Stroke in Brazil: a neglected disease. **São Paulo Medical Journal**, v. 123, p. 3-4, 2005.

LUCAS, S.-M.; ROTHWELL, N. J.; GIBSON, R. M. The role of inflammation in CNS injury and disease. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, p. 232-240, 2006.

MACKLIS, J. D.; MADISON, R. D. Progressive incorporation of propidium iodide in cultured mouse neurons correlates with declining electrophysiological status: a fluorescence scale of membrane integrity. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 31, p. 43–46, 1990.

MICHAEL, K. M.; SHAUGHNESSY, M. Stroke prevention and management in older adults. **Journal of Cardiovascular Nursing**, v. 21, p. 21-26, 2006.

MIN, K. J.; JOU, I.; JOE, E. Plasminogen-induced IL-1beta and TNF-alpha production in microglia is regulated by reactive oxygen species. **Biochemical Biophysical Research Communities**, v. 312, p. 969-974, 2003.

Missouri Botanical Garden, www.mobot.org, acesso em 4 de novembro de 2008.

MITANI, A., YANASE, H., SAKAI, K., WAKE, Y., & KATAOKA, K. Origin of intracellular Ca²⁺ elevation induced by *in vitro* ischemia-like condition in hippocampal slices. **Brain Research**, v. 601, p. 103-110, 1993.

MORGAN, S. C.; TAYLOR, D. L.; POCOCK, J. M. Microglia release activators of neuronal proliferation mediated by activation of mitogen-activated protein kinase, phosphatidylinositol-3-kinase/Akt and d-Notch signalling cascades. **Journal of Neurochemistry**, v. 90, p. 89–101, 2004.

NETTO, C. A., HODGES, H., SINDEN, J. D., PEILLET, E., KERSHAW, T., SOWINSKI, P., MELDRUM, B. S., GRAY, J. A. Effects of fetal hippocampal

fieldgrafts on ischemic-induced deficits in spatial navigation in the water maze. **Neuroscience**, v. 54, p. 69-92, 1993.

NEUMANN, J.; GUNZER, M.; GUTZEIT, H. O.; ULRICH, O.; REYMANN, K. G.; DINKEL, K. Microglia provide neuroprotection after ischemia. **FASEB Journal**, v. 20, p. 714-716, 2006.

NIWA, M., HARA, A., IWAY, T., WANG, S., HOTTA, K., MORI H. & UEMATSU, T. Caspase activation as an apoptotic evidence in the gerbil hippocampal CA1 pyramidal cells following transiente forebrain ischemia. **Neuroscience Letters**, v. 300, p. 103-106, 2001.

NORABERG, J.; KRISTENSEN, B. W.; ZIMMER, J. Markers for neuronal degeneration in organotypic slice cultures. **Brain Research Protocols**, v. 3, p. 278–290, 1999.

O'BRIEN, P.; CARRASCO-POZO, C.; SPEISKY, H. Boldine and its antioxidant or health-promoting properties. **Chemico-Biological Interactions**, v.159, p. 1-17, 2005.

ORDY, J. M., WENGENACK, T. M., BIALOBOCK, P., COLEMAN, P. D., RODIER, P., BAGGS, R. B., DUNLAP, W. P., KATEST, B. Selective vulnerability and early progression of hippocampal CA1 pyramidal cell degeneration and GFAP positive astrocyte reactivity in the rat four-vessel occlusion model of transient global ischemia. **Experimental Neurology**, p. 128-139, 1993.

OZES, O. N., MAYO, L. D., GUSTIN, J. A., PFEFFER, S. R., PFEFFER, L. M. & DONNER, D. B. NF κ B Activation by Tumour Necrosis Factor Requires the Akt Serine-threonine kinase. **Nature**, v. 401, p. 82-85, 1999.

PAP, M. & COOPER, G. M. Role of Glycogen Synthase Kinase-3 in the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Cell Survival Pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 19929-19932, 1998.

PETERSON, G. L. Determination of total protein. **Methods in Enzymology**, v. 91, p. 95–119, 1983.

PHILLIS, J. W.; O'REGAN, M. H.; ESTEVEZ, A. Y.; SONG, D.; VANDERHEIDE, S. J. Cerebral energy metabolism during severe ischemia of varying duration and following reperfusion. **Journal of Neurochemistry**, v. 67, p. 1525-1531, 1996.

POLAZZI, E.; GIANNI, T.; CONTESTABILE, A. Microglial cells protect cerebellar granule neurons from apoptosis: evidence for reciprocal signaling. **Glia**, v. 36, p. 271-280, 2001.

POSSEL, H., NOACK, H., AUGUSTIN, W.; KEIHOFF, G.; WOLF, G. 2,7-Dihydrodichlorofluorescein diacetate as a fluorescent marker for peroxynitrite formation. **FEBS Letters**, v. 416, p.175-178, 1997.

PRICE, D. New order from neurological disorders. **Nature**, v. 399, p.A3-A5, 1999.

QUEZEDA, M.; ASECIO, 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. **Journal of Food Science**, v. 69, p.371-376, 2004.

SAHA, R. N.; LIU, X.; PAHAN, K. Up-regulation of BDNF in Astrocytes by TNF- α : A case for the neuroprotective role of cytokine. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 1, p. 212-222, 2006.

SANDERCOCK, P., GUBITZ, G., FOLEY, P., COUNSELL, C. Antiplatelet therapy for acute ischaemic stroke. **Cochraen Database System Reviews**, v. 2, 2003.

SANTANAM, N.; PENUMETCHA, M.; SPEISKI, H.; PARTHASARATHY, S. A novel alkaloid antioxidant, boldine and synthetic antioxidant, reduced form of RU486, inhibit the oxidation of LDL in vitro and atherosclerosis in vivo in LDLR-/- mice. **Atherosclerosis**, v. 173, p. 203-210, 2004.

SAYRE, L. M.; PERRY, G.; SMITH, M. A. Oxidative stress and neurotoxicity. **Chemical Research in Toxicology**, v. 21, p. 172-188, 2008.

SIMÃO, F.; ZAMIN, L. L.; FROZZA, R.; NASSIF, M.; HORN, A. P.; SALBEGO, C. G. Protective profile of oxcarbazepine against oxygen-glucose deprivation in

organotypic hippocampal culture could involve PI3K cell signaling pathway. **Neurological Research**, *in press*.

SONG, G.; OUYANG, G.; BAO, S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 9, p. 59-71, 2005.

SPEISKI, H.; CASSELS, B. K. Boldo and boldine: an emerging case of natural drug development, **Pharmacological Research**, v. 29, p. 1–12, 1994.

SRIRAM, K.; O'Callaghan, J. P. Divergent roles of Tumor Necrosis Factor- α in the brain. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 2, p. 140-153, 2007.

STOPPINI, L., BUCHS, P.-A. & MULLER, D. A simple method for organotypic cultures of nervous system. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 37, p. 173-182, 1991.

STRASSER, U.; FISCHER, G. Quantitative measurement of neuronal degeneration in organotypic hippocampal cultures after combined oxygen/glucose deprivation. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 57, p. 177–186, 1995.

URZÚA, A., ACUÑA, P. Alkaloids from the bark of *Peumus boldus*, **Fitoterapia**, v. 54, p. 175–177, 1983.

VALENTIM, L. M., GEYER, A. B., TAVARES, A., CIMAROSTI, H., WORM, P.V., RODNIGHT, R., NETTO, C. A., SALBEGO, C. G. Effects of global cerebral ischemia and preconditioning on heat shock protein 27 immunoccontent and phosphorylation in rat hippocampus. **Neuroscience**, v. 107, p.43-49, 2001.

VALENTIM, L. M.; RODNIGHT, R.; GEYER, A. B.; HORN, A. P.; TAVARES, A.; CIMAROSTI, H.; NETTO, C. A.; SALBEGO, C. G. Changes in heat shock protein 27 phosphorylation and immunoccontent in response to preconditioning to oxygen and glucose deprivation in organotypic hippocampal cultures. **Neuroscience**, v. 118, p. 379-386, 2003.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T. D.; MAZUR, M.; TESLER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human diseases. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 39, p. 44-84, 2007.

WAHLGREN, N.G., AHMED, N. Neuroprotection in cerebral ischaemia: facts and fancies--the need for new approaches. **Cerebrovascular Diseases**, v. 17, p. 153-166, 2004.

WANG, H. K.; PARK, U. J.; KIM, S. Y.; LEE, J. H.; KIM, S. U.; GWAG, B. J.; LEE, Y. B. Free radical production in CA1 neurons induces MIP-1alpha expression, microglia recruitment, and delayed neuronal death after transient forebrain ischemia. **Journal of Neuroscience**, v. 28, p. 1721-1727, 2008.

YAMASHIMA, T. Implication of cysteine proteases calpain, cathepsin and caspase in ischemic neuronal death of primates. **Progress in Neurobiology**, v. 62, p. 273-295, 2000.

YAMASHITA, L. F.; FUKUJIMA, M. M.; GRANITOFF, N.; do PRADO, G. F. Paciente com acidente vascular cerebral isquêmico já é atendido com mais rapidez no Hospital São Paulo. **Arquivo de Neuro-Psiquiatria**, v. 62, p. 96-102, 2004.

YANG, G., KITAGAWA, K., OHTSUKI, T., KUWABARA, K., MABUCHI, T., YAGITA, Y., TAKAZAWA, K., TANAKA, S., YANAGIHARA, T., HORI, M. & MATSUMOTO, M. Regional difference of neuronal vulnerability in the murine hippocampus after transient forebrain ischemia. **Brain Research**, v. 870, p. 195-198, 2000.

YOUN, Y. C.; KWON, O. S.; HAN, E. S.; SONG, J. H.; SHIN, Y. K.; LEE, C. S. Protective effect of boldine on dopamine-induced membrane permeability transition in brain mitochondria and viability loss in PC12 cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 63, p. 495-505, 2002.

ZAMIN, L. L., DILLENBURG-PILLA, P., ARGENTA-COMIRAN, R., HORN, A. P., SIMÃO, F., NASSIF, M., GERHARDT, D., FROZZA, R. L., SALBEGO, C. Protective effect of resveratrol against oxygen–glucose deprivation in organotypic hippocampal slice cultures: Involvement of PI3-K pathway. **Neurobiology of Disease**, v. 24, p. 170-182, 2006.

ZENG, Y. S. & XU, Z. C. Co-existence of necrosis and apoptosis in rat hippocampus following transient forebrain ischemia. **Neuroscience Research**, v. 37, p. 113-125, 2000.

ZETLER, G. Neuroleptic-like, anticonvulsant and antinociceptive effects of aporphine alkaloids: bulbocapnine, corytuberine, boldine and glaucine, **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie**, v. 296, p. 255–281, 1988.

ZHAN, R. Z., WU, C., FUJIHARA, H., TAGA, K., QI S., NAITO, M. & SHIMOJI, K. Both caspase-dependent and caspase-independent pathways may be involved in hippocampal CA1 neuronal death because of loss of cytochrome c from mitochondria in a rat forebrain ischemia model. **Journal of Cerebral Blood Flow Metabolism**, v. 21, p. 529-540, 2001.

ZIETLOW, R.; DUNNETT, S. B.; FAWCETT, J. W. The effect of microglia on embryonic dopaminergic neuronal survival in vitro: diffusible signals from neurons and glia change microglia from neurotoxic to neuroprotective. **European Journal of Neuroscience**, v. 11, p. 1657–1667, 1999.