

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA

Taís Vidal Palma

**MECANISMO ANTITUMORAL DA BERBERINA EM LINHAGEM DE
CÉLULAS U87MG DE GLIOBLASTOMA MULTIFORME**

Santa Maria, RS
2017

Taís Vidal Palma

**MECANISMO ANTITUMORAL DA BERBERINA EM LINHAGEM DE CÉLULAS
U87MG DE GLIOBLASTOMA MULTIFORME**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito para obtenção do título de **Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica**.

Orientador: Prof^a Dr^a Cinthia Melazzo de Andrade
Coorientador: Dr^a Micheli Mainardi Pillat

Santa Maria, RS
2017

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Palma, Taís Vidal Palma

MECANISMO ANTITUMORAL DA BERBERINA EM LINHAGEM DE
CÉLULAS U87MG DE GLIOBLASTOMA MULTIFORME / Taís Vidal
Palma Palma.- 2017.

48 p.; 30 cm

Orientadora: Cinthia Melazzo de Andrade Andrade

Coorientadora: Micheli Mainardi Pillat Pillat

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, RS, 2017

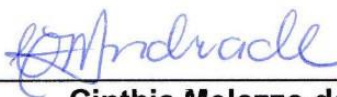
1. Glioblastoma multiforme 2. Berberina 3. Apoptose
4. Linhagem celular U87MG I. Andrade, Cinthia Melazzo de
Andrade II. Pillat, Micheli Mainardi Pillat III. Título.

Taís Vidal Palma

**MECANISMO ANTITUMORAL DA BERBERINA EM LINHAGEM DE CÉLULAS
U87MG DE GLIOBLASTOMA MULTIFORME**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito para obtenção do título de **Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica**.

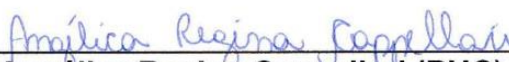
Aprovado em 31 de julho de 2017:



**Cinthia Melazzo de Andrade
(Presidente/Orientador)**



**Micheli Mainardi Pillat
(Coorientador)**



Angélica Regina Cappellari (PUC)



Maria do Carmo dos Santos Araújo (UNIFRA)

Santa Maria, RS
2017

***Dedico esta dissertação a minha filha,
à qual sempre estive comigo em todas minhas escolhas.***

AGRADECIMENTOS

Agradeço acima de tudo a Deus por abençoar a minha vida, a minha família e pelas oportunidades oferecidas ao longo desta caminhada.

À minha filha Nathália, por ser uma filha maravilhosa.

Ao meu marido José Eduardo, pelo apoio e companheirismo.

À minha mãe, Sandra, por ser uma mãe amiga e acima de tudo uma mulher guerreira. Aos meus irmãos Teonas, Tatiana, Júlia e Silvaní pelo companheirismo e amizade.

Em especial a professora Maria, por tudo que me ensinou e continua ensinando, me apresentou o “mundo científico” , com bons conselhos, uma pessoa que admiro muito.

Às professoras Rosa e Vera, por terem me concedido a oportunidade de estágio em seu grupo de pesquisa. Agradeço muito mesmo.

À professora Cinthia, um exemplo de profissional, agradeço pela oportunidade, dedicação e grande amizade que marcará para sempre minha vida. A sua visão de mundo e de trabalho em equipe servem de incentivo para buscar o conhecimento e seguir em frente.

Aos meus colegas de laboratório, pela parceria na realização dos trabalhos e por contribuírem para a concretização da minha pesquisa.

Ao amigo Jessié, pela orientação, apoio e muitos momentos de diversão, muito obrigada.

As amigas Jéssica e Luana, pela parceria e apoio desde os tempos da graduação, muito obrigada.

À Micheli, que me ajudou no mestrado, uma pessoa incrível e parceira.

À Aline a amiga que o mestrado me deu.

Aos professores e funcionários do PPGBTOX -UFSM.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro durante o mestrado.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

MECANISMO ANTITUMORAL DA BERBERINA EM LINHAGEM DE CÉLULAS U87MG DE GLIOBLASTOMA MULTIFORME

AUTOR: Taís Vidal Palma
ORIENTADOR: Prof^a Dr^a Cinthia Melazzo de Andrade
CO-ORIENTADOR: Dr^a Micheli Mainardi Pillat

O glioblastoma multiforme (GBM) é o tumor com maior prevalência entre os gliomas. As células do GBM apresentam alto pleomorfismo, com células não diferenciadas, com atipia celular e alta atividade mitótica, sendo considerados tumores incuráveis com a maior taxa de mortalidade entre os tumores encefálicos. A berberina (BBR), um alcalóide isoquinolina, é um composto encontrado em plantas medicinais como *Coptis chinensis*. A BBR demonstrou ter atividade protetora em células mesenquimais e neurônios, e propriedades antitumorais em células de câncer de mama e hepatocarcinoma, como inibição da proliferação celular, a indução da parada do ciclo celular e apoptose. O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos antitumorais da BBR na linhagem celular U87MG de GBM, bem como, identificar se tais efeitos são mediados pelo estresse oxidativo e vias apoptóticas canônicas. Após o tratamento com diferentes concentrações de BBR (10, 25 100 e 250 μ M), por 24, 48 e 72 horas, as amostras foram analisadas pelo método de MTT, a fim de estimar a viabilidade celular. Este alcalóide significativamente reduziu a viabilidade celular/proliferação das células U87MG de uma maneira dependente da concentração e do tempo. Posteriormente, por meio de análises do ciclo celular, observou-se que concentrações a partir de 25 μ M de BBR por apenas 24 horas foram suficientes para suprimir a proliferação celular, evidenciada por citometria de fluxo. Tal concentração e tempo de exposição à BBR também foram capazes de desencadear a apoptose, visto que, observou-se um grande aumento na porcentagem (53,5% \pm 11,15) de células em apoptose inicial (células Anexina V⁺ iodeto de propídio⁻) comparado a amostras não tratadas (7,5% \pm 4,6). A apoptose induzida por BBR foi independente da atividade de AMPK e não envolveu mudanças na expressão de caspase 3 e p-p53. A BBR (25 μ M/24h) aumentou o estresse oxidativo nas células U87MG, observado pelo aumento nos níveis das espécies reativas de oxigênio, TBARS e carbonilação de proteínas. Portanto, a BBR tem potente efeito indutor da apoptose em U87MG e sugere-se que este composto pode ser um potencial candidato para o tratamento adjuvante do GBM.

PALAVRAS-CHAVE: Glioblastoma multiforme. Berberina. Apoptose. Linhagem celular U87MG.

ABSTRACT

ANTITUMORAL MECHANISM OF BERBERINE IN GLIOBLASTOMA MULTIFORME U87MG CELL

AUTHOR: Taís Vidal Palma
ADVISOR: Dr.^a Cinthia Melazzo de Andrade
CO-ADVISOR: Dr.^a Micheli Mainardi Pillat

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most prevalent tumor among gliomas. GBM cells present high pleomorphism, with undifferentiated cells, with cellular atypia and high mitotic activity, being considered as incurable tumors with the highest mortality rate among brain tumors. Berberine (BBR), an alkaloid isoquinoline, is a compound found in medicinal plants such as *Coptis chinensis*. Studies have been showed that BBR presents protective activity in mesenchymal cells and neurons, and antitumor properties, such as inhibition of cell proliferation, induction of cell cycle arrest, and apoptosis in breast cancer and hepatocarcinoma. The aim of this study was to investigate the antitumor effects of BBR in the GBM U87MG cells, as well as to identify whether such effects are mediated by oxidative stress and canonical apoptotic pathways. After treatment with several concentrations of BBR (10, 25, 100 and 250 μ M) for 24, 48 and 72 hours, the samples were analyzed by MTT assay and it was observed that BBR inhibited cell viability of U87MG cells in a concentration- and time-dependent manner. Afterwards, it was observed that BBR, starting at a concentration of 25 μ M for 24hs, significantly suppressed proliferation evidenced by flow cytometry techniques, while significantly increased early apoptosis (53.5% \pm 11.15 of annexin V⁺ propidium iodide⁻ cells) compared to untreated cells (7.5% \pm 4.6). BBR-induced apoptosis was independent on AMPK activity and did not change caspase 3 and p-p53 levels. Moreover, BBR (25 μ M / 24h) increased oxidative stress in U87MG cells, evidenced by high levels of reactive oxygen species, TBARS and protein carbonylation. Considering the antitumor effects of BBR in U87MG cells, it is suggest that this compound may be a potential candidate for adjuvant GBM treatment.

KEYWORDS: Glioblastoma multiforme. Berberine. Apoptosis. U87MG cell.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: (A) Ressonância magnética mostrando o tumor na região frontal; (B) RT sagital com contraste; (C) RT coronal com contraste; (D) RT axial da extensão do tumor.

Figura 2: Histopatologia do glioblastoma multiforme. Coloração H&E mostrando imagem da região em aumento 40x. (A) células atípicas; (B) mitose; (C) proliferação vascular; (D) necrose com "células fantasmas".

Figura 3: Estrutura química da Berberina

Figura 4: A: *Coptis chinensis*; B: rizoma seco; C: carpelos.

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPK	Proteína cinase ativada por AMP
BBR	Berberina
CAT	Catalase
EGRF	Receptor do fator de crescimento endotelial
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GBM	Glioblastoma multiforme
GPx	Glutathiona peroxidase
IDH	Isocitrato desidrogenase
INCA	Instituto Nacional do Câncer
OMS	Organização mundial da saúde
PTEN	Fosfatase e homólogo da tensina
RE	Retículo endoplasmático
RM	Ressonância magnética
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido dimutase
TC	Tomografia computadorizada
TMZ	Temozolamida
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVO GERAL.....	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1 CÂNCER	14
3.2 GLIOBLASTOMA MULTIFORME (GBM).....	15
3.3 APOPTOSE E ESTRESSE OXIDATIVO	18
3.4 BERBERINA	21
4 MANUSCRITO CIENTÍFICO	25
ANTITUMORAL MECHANISM OF BERBERINE IN GLIOBLASTOMA MULTIFORME U87MG CELLS	26
Abstract	27
Introduction.....	28
Materials and methods	28
Results	32
Discussion	33
References	36
Legends	38
Figures	39
5 CONCLUSÃO	43
6 REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

O glioblastoma multiforme (GBM) é o tumor com maior prevalência entre os gliomas, de crescimento rápido causando a destruição de extensas áreas de tecido nervoso e edema, considerado assim, o mais maligno entre os glioblastomas. (MONTGOMERY, R.M.; QUEIROZ, L.S.; ROGERIO, F., 2015; ZHOU, M. et al., 2016). O prognóstico para os pacientes é bem reservado, visto que a sobrevida dos mesmos é curta após o diagnóstico. No entanto, mesmo com a alta malignidade do GBM, as metástases ocorrem somente no sistema nervoso central (SNC), sendo raras em outros órgãos (NAKADA et al., 2007). Devido a sua prevalência, malignidade e grande poder de migração e invasão, o GBM possui uma alta taxa de mortalidade (CHEN, X. et al., 2013).

Mesmo com terapias multimodais que incluem ressecção cirúrgica, radioterapia e quimioterapia, o tratamento para o GBM é considerado apenas paliativo, o que gera um mau prognóstico aos pacientes (CHENG, L. et al., 2011). É preconizado no tratamento convencional para este tumor, após a ressecção cirúrgica, a utilização de radioterapia e o medicamento Temozolamida (TMZ). Alguns avanços terapêuticos têm sido relatados com a utilização de tratamento adicional com TMZ em doses mais frequentes; e terapia com anticorpos antiangiogênicos contra o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF). Entretanto, o tempo de vida médio dos pacientes é de aproximadamente 14 meses (NONES, J. et al. 2010).

O mau prognóstico do glioblastoma está relacionado à capacidade das células se infiltrarem no tecido sadio, limitando a remoção total do tumor por cirurgia, associado ao fato da barreira hematoencefálica ser um obstáculo para os quimioterápicos, e por último, devido à heterogeneidade do tumor, há a presença de células resistentes ao tratamento anticâncer (STUPP, R. et al., 2007). Assim, devido à limitação dos tratamentos, existe ainda a necessidade de agentes terapêuticos adjuvantes.

Fitoquímicos têm sido estudados como quimiopreventivos e quimioterápicos contra vários tipos de câncer (BARZEGAR, E. et al., 2015). Neste contexto, destaca-se a berberina um alcalóide quaternário isoquinolina isolado de vários tipos de plantas, entre estas a *Coptis chinensis*. A berberina possui ação antimicrobiana, anti-inflamatória e antioxidante (ORTIZ, L.M. et al., 2014-a/b), e em tumor de mama

apresenta efeitos antiangiogênico, apoptótico, inibidor da migração e da proliferação celular (BARZEGAR, E. et al., 2015).

Na linhagem de câncer pancreático foi observado que a Berberina induziu a geração de espécies reativas, o que resultou na apoptose (PARK, S.H. et al., 2015). Outro estudo demonstrou que a berberina induz a formação de espécies reativas como superóxido e peroxinitrito, derivados das mitocôndrias, e estes são capazes de ativar a proteína quinase ativada por AMP (AMPK) (HAN, Y. et al., 2010). A AMPK pode ser ativada em condições de estresse metabólico, tais como hipóxia, choque térmico, estresse oxidativo, ou quando o nível de ATP está esgotado para regular os níveis de energia da célula. (YU, R. et al., 2014). Em câncer colorretal a berberina ativou AMPK, e a fosforilação de p53 mostrou-se dependente da ativação de AMPK, ativando a caspase 3, sugerindo que a berberina suprime a proliferação tumoral via AMPK (LI, W. et al., 2015). A transcrição do gene p53 resulta em uma fosfoproteína nuclear que induz a apoptose celular quando ocorre falha nos mecanismos de reparo de danos ao DNA, impedindo assim a proliferação de células mutantes (CORRÊA, M.P. et al., 2009).

Desta forma, o GBM permanece com tratamento limitado, destinando um mau prognóstico aos pacientes. De uma maneira geral ainda não é possível intervir nos eventos celulares envolvidos na indução e progressão do tumor, o que torna importante avaliar os efeitos antitumorais da berberina, com o intuito de demonstrar por quais mecanismos este composto age como um antitumoral em Glioblastoma multiforme.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Investigar os efeitos antitumorais da berberina na linhagem celular U87MG de glioblastoma multiforme humano.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Na linhagem celular U87MG tratada e não tratada com berberina foi avaliado:

- A viabilidade celular;
- O ciclo celular;
- A apoptose;
- As vias apoptóticas canônicas (AMPK, p53 e caspase 3);
- O estresse oxidativo, por meio de marcadores de dano oxidativo e atividade de enzimas antioxidantes.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CÂNCER

O câncer é uma doença caracterizada pelo progressivo acúmulo de mutações somáticas no DNA da célula, levando a alterações na expressão ou função de genes que atuam na manutenção da homeostasia da célula. Assim, a célula mutada não obedecerá mais aos sinais normais de controle de proliferação, morte e diferenciação celular, e sofrerá expansão clonal (MARTINCORENA, I; CAMPBELL, P.J, 2015).

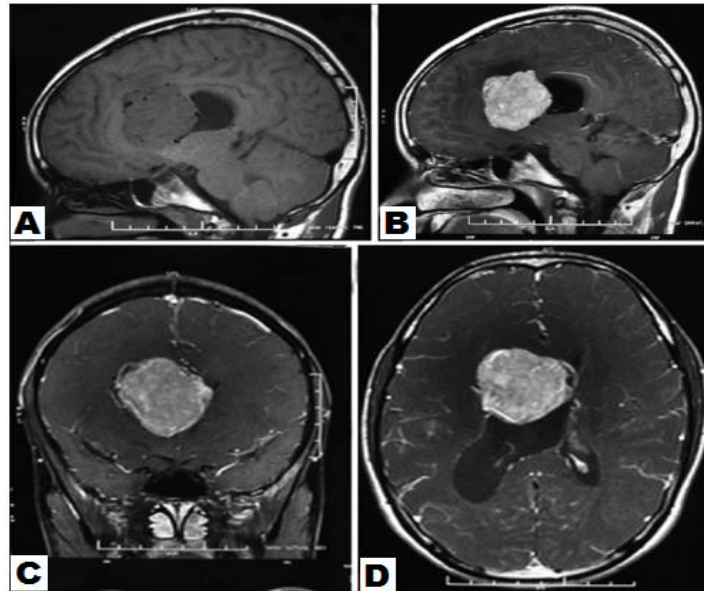
Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) a estimativa para 2030, são de 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com câncer (BRASIL, 2011). Para o Brasil, as estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA), são de 600 mil casos novos de câncer nos anos de 2016-2017. Dentre todos os tumores malignos no mundo, o câncer do Sistema Nervoso Central (SNC) corresponde a cerca de 2%, sendo as maiores taxas encontradas nos países europeus (BRASIL, 2015).

Os tumores do SNC, em grande parte, originam-se no encéfalo, nervos cranianos e meninges. Entre estes, os gliomas são o tipo histológico mais frequente, representando de 40% a 60% de todos os tumores primários do SNC, seguido pelos meningiomas (20-30%), neurilemomas (5-10%), e outros menos comuns como os adenomas pituitários, meduloblastomas e tumores da medula espinhal e nervos periféricos (BRASIL, 2015).

A etiologia dos gliomas não é clara, poucos fatores de riscos foram associados a estes tumores, entre eles: altas doses de radiação; síndromes hereditárias; e idade avançada. No entanto, carcinogênicos conhecidos para a maioria dos tumores, como álcool e tabagismo, não foram identificados como fatores de risco para gliomas (BONDY, M.L., et al., 2008). Outra característica que se destaca é o fato destes tumores afetarem mais os homens do que as mulheres (BRASIL, 2015).

Os gliomas são os tumores encefálicos mais comuns em adultos (PAN, Y. et al., 2017). Entre os gliomas, o glioblastoma multiforme (GBM) (Figura 1) é o mais prevalente, correspondendo a aproximadamente 70% dos astrocitomas e a 15% de todas as neoplasias intracranianas (MONTGOMERY, R.M. et al., 2015)

Figura 1: (A) Ressonância magnética mostrando o tumor na região frontal; (B) RT sagital com contraste; (C) RT coronal com contraste; (D) RT axial da extensão do tumor.



Fonte: Adaptado de PATNAIK, A.; MISHRA, S.S.; SENAPATI, S.B., 2017.

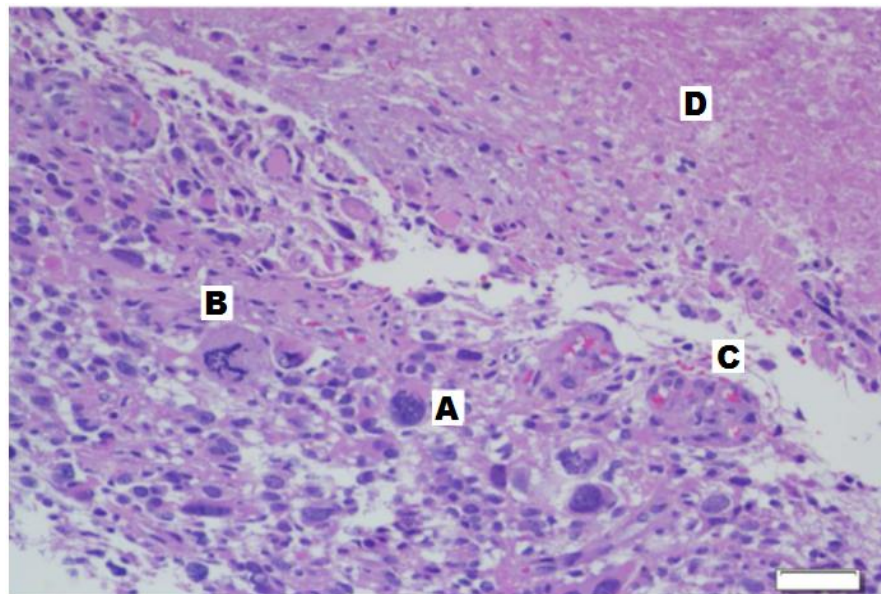
3.2 GLIOBLASTOMA MULTIFORME (GBM)

A gliomagenese é um processo no qual ocorre várias alterações genéticas em células encefálicas normais e essas mutações levam estas células a se transformarem em malignas (SALAZAR-RAMIRO, A. et al., 2016). Os gliomas surgem no SNC de células gliais, como os astrócitos, oligodendrócitos e células microgliais (PAW, I. et al., 2015).

Conforme a nova classificação de 2016, para tumores do SNC, da OMS, os glioblastomas (tumores grau IV) são divididos em glioblastoma IDH-selvagem (Isocitrato desidrogenase- IDH) (90% dos casos) e glioblastoma IDH-mutante (10%). Os glioblastomas IDH-selvagem são definidos como tumores primários e predomina em pacientes com mais de 55 anos, já os IDH-mutante correspondem aos glioblastomas secundários com histórico de glioma difuso e, preferencialmente, surge em pacientes jovens (LOUIS, D.N. et al., 2016).

A histopatologia do GBM (Figura 2) mostra células astrocíticas com alto pleomorfismo, células não diferenciadas, com atipia celular e alta atividade mitótica (YOUNG, R.M. et al., 2015). As características histopatológicas entre GBM primários e secundários são indistinguíveis. No entanto, GBM primários possuem receptor para fator de crescimento epidérmico (EGFR), mutação na fosfatase e o homólogo de tensina (PTEN) e perda do cromossomo 10, enquanto mutações em p53 são comuns em GBM secundário (SALAZAR-RAMIRO, A. et al., 2016).

Figura 2: Histopatologia do glioblastoma multiforme. Coloração H&E mostrando imagem da região em aumento 40x. (A) células atípicas; (B) mitose; (C) proliferação vascular; (D) necrose com "células fantasmas".



Fonte: Adaptado de YOUNG, R.M. et al., 2015.

Devido ocorrerem no SNC, os sinais e sintomas mais comuns encontrados em pacientes com GBM são paralisia unilateral, aumento da pressão intracraniana, distúrbio na linguagem, convulsões, déficits neuropsicológicos, perturbação visual, tonturas, ataxia e cefaléia (GRANT, R., 2004; STARK, A.M. et al., 2005).

Segundo o Ministério da Saúde (BRASIL), para o diagnóstico de tumores encefálicos é necessária a avaliação inicial do doente por exame clínico neurológico

detalhado e exames de neuroimagem. Deve ser realizado tomografia computadorizada contrastada (TC) e ressonância magnética (RM), além de espectroscopia quando disponível. Ainda, podem ser realizados radiografia de crânio, arteriografia cerebral e mielografia. No entanto, o diagnóstico definitivo deve ser por histopatologia do tumor de acordo com critérios de St. Anne-Mayo (atipias nucleares, índice mitótico, proliferação endotelial e grau de necrose) e classificados segundo a OMS (BRASIL, 2012).

Gliomas malignos, como o GBM, são tumores incuráveis com a maior taxa de mortalidade entre os tumores encefálicos, devido sua alta agressividade e poder angiogênico. Os tratamentos para este tumor incluem cirurgia, radioterapia e quimioterapia, no entanto, o prognóstico para os pacientes é desfavorável (JIANG, Y.S. et al., 2014). No GBM, o tratamento, passa por uma segura ressecção cirúrgica máxima limitada a não causar prejuízo ao paciente, seguida de tratamento por radiação combinada com o medicamento temozolamida (TMZ) (YE, F. et al., 2013). Devido à infiltração tumoral, a ressecção cirúrgica completa torna-se difícil, o que contribui para a recidiva (STROJNIK, T. et al., 2010). As células cancerosas de GBM têm a capacidade de invadir e migrar para regiões distantes do tumor dentro do encéfalo, mas raramente são capazes metastatizar para outro lugar do corpo (PAW, I. et al., 2015).

O GBM é o tumor de maior malignidade do SNC, e seu tratamento é desafiador, visto que os pacientes diagnosticados com este tipo de neoplasia e tratados, tem uma taxa de sobrevivência muito baixa para cinco anos, de apenas 3,3% (BONDY, M.L., et al., 2008; YULYANA, Y. et al., 2016). Em adição, o GBM apresenta alta heterogeneidade (células em diferentes estágios de diferenciação), infiltração cerebral difusa, necrose, alta taxa de proliferação celular e resistência a tratamentos (SALAZAR-RAMIRO, A. et al., 2016). Mesmo com tratamento rigoroso, a taxa média de sobrevida para os pacientes com GBM é em torno de 14 meses (HUANG, W.J. et al., 2017; XIPELL, E. et al., 2016), e para pacientes que não recebem tratamento a sobrevida é cerca de cinco meses (SALAZAR-RAMIRO, A. et al., 2016).

As terapias anti-câncer visam eliminar as células tumorais que proliferam rapidamente. O GBM possui células tronco que podem se auto-renovar e reconstituir o tumor original (LIU, Q. et al., 2009). Células tronco cancerosas são células com a capacidade de se multiplicar formando um novo tumor, o que pode levar à recorrência

do mesmo (OLIVA, C.R. et al., 2017). Assim, a pesquisa de Liu, Q. et al. (2009), demonstrou que o surgimento da radioquimioresistência pode surgir devido a expansão de clones de células tronco de GBM quiescentes que expressam resistência ao estresse, sendo que, as células tronco de GBM são mantidas em fase de latência e espontaneamente podem proliferar formando um novo tumor.

3.3 APOPTOSE E ESTRESSE OXIDATIVO

A apoptose é a morte celular programada (HASSAN, M. et al., 2014). Sabe-se que diferentes estímulos e rotas intracelulares podem desencadear a apoptose. Dentre os quais se destacam as vias canônicas, ativação de receptores, insuficiência de fatores de crescimento, presença de toxinas, estresse oxidativo e vias mediadas por cálcio (influxo através de canais da membrana plasmática ou liberação do retículo endoplasmático (RE). Adicionalmente, é válido mencionar que a liberação de citocromo c (a partir de mitocôndrias) e de cálcio (a partir do RE) para o citosol podem ser requisitos para a apoptose (MATTSON, M.P.; CHAN, S.L., 2003).

A apoptose é um mecanismo para manter a homeostase dos tecidos, eliminando células nocivas ou desnecessárias e controlando a proliferação celular anormal (GOLDAR, et al., 2015). As vias de indução da apoptose podem bloquear a carcinogênese, enquanto que a desregulação das vias apoptóticas poderão promover a tumorigênese e inclusive tornar as células resistentes aos tratamentos (HASSAN, M. et al., 2014).

A apoptose pode ser ativada por duas vias: pela via extrínseca, onde o fator de necrose tumoral recruta a proteína FADD e as caspases 8 e 10 em complexos, ou pela via intrínseca ou mitocondrial, quando o estresse ativa proteínas Bax e Bak que são pró-apoptóticas, que inibem Bcl-2, o citocromo c é liberado da mitocôndria e se liga a proteína Apaf-1 e a caspase 9. Essas caspases iniciais podem ativar as caspases efetoras (Caspase-3, Caspase-6 e Caspase-7), que iniciam a quebra de proteínas celulares (ADAMS, J.M.; CORY, S., 2007).

A expressão de Bcl-2 e Bax, assim como a regulação da parada celular e da morte celular são reguladas por p53. Sobre Bax, a p53 promove uma regulação positiva. Ainda, p53 pode ativar a apoptose por vias que dependam ou não de

transcrição, ou sob estresse induzir a parada do ciclo celular e a apoptose (HASSAN, M. et al., 2014).

As células cancerígenas podem evadir da apoptose pela alteração das vias apoptóticas durante a transcrição, tradução e pós-tradução. As proteínas anti-apoptóticas são mais expressas em células cancerosas para superar sinais de estresse. Esta maior expressão está relacionada a recorrência, prognóstico e resistência terapêutica (GOLDAR, S. et al., 2015).

Em alguns tipos de câncer, a atividade ou expressão de p53 pode estar alterada ou ser perdida, o que, promoverá a proliferação tumoral. No entanto, a ativação de p53 pode ser conferida pela proteína cinase ativada por AMP (AMPK), que fosforila p53 na Ser15, assim diminuindo a progressão tumoral, utilizando uma via para conservar energia na célula (McCARTY, M.F., 2014)

A AMPK também tem sido relacionada a agir como um regulador do ciclo celular e estar envolvida na sobrevivência e apoptose de células cancerígenas (YU et al., 2014). AMPK pode ser ativada quando o cálcio livre aumenta, situação que também sinaliza estresse oxidativo (McCARTY, M.F., 2014). Quando há um descontrole homeostático da concentração de cálcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$), ou mudanças sutis no interior dos compartimentos intracelulares pode ocorrer apoptose. Vários estímulos podem afetar a concentração de $[Ca^{2+}]_i$, quando o cálcio armazenado no retículo endoplasmático é translocado para a mitocôndria, sendo este um sinal importante para a ativação do processo apoptótico (ORRENIUS, S.; ZHIVOTOVSKY, B.; NICOTERA, P., 2003).

Envolvida na regulação metabólica energética, a proteína tumoral p53, também é responsável por regular genes de enzimas envolvidos na regulação redox, como a enzima superóxido dismutase e glutathiona peroxidase. Várias mutações podem afetar a p53, causando mudanças na sua estrutura e função, fazendo com que aumente o estresse oxidativo em pacientes com essas mutações (SALAZAR-RAMIRO, A. et al., 2016).

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio que ocorre entre os sistemas oxidante e antioxidante. Este desequilíbrio favorece o aumento das espécies reativas de oxigênio (ERO). Estas ERO englobam as espécies radicalares também chamados de radicais livres (apresenta elétron desemparelhado na sua camada

eletrônica) e as espécies não radicalares (não apresenta elétron desemparelhado na sua camada eletrônica) (PISOSCHI, A.M.; POP, A., 2015), e dentre as ERO, temos o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical hidroxila (OH) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que causam vários danos e morte às células (CHEN, Y. et al., 2008). Essas ERO são geradas devido uma redução univalente, no processo em que as células consomem o oxigênio (que recebe quatro elétrons), e o reduzem a água (H_2O) (PISOSCHI, A.M.; POP, A., 2015).

As ERO são geradas constantemente no metabolismo aeróbico normal das células e os efeitos biológicos destas espécies vão ser dependentes da sua concentração (HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C., 2007). Níveis baixos de ERO são necessários para a regulação fisiológica da célula (sinais de transdução, proliferação celular, diferenciação, apoptose, etc.). No estresse oxidativo, há o aumento destas espécies, e esse aumento é citotóxico, causando morte celular, mutações e carcinogênese (WEYDERT, C.J.; CULLEN, J.J., 2010).

Algumas situações patológicas, como doenças inflamatórias, isquemia e câncer, induzem a superprodução de ERO. Ainda, tratamentos como radiação e quimioterapia também são responsáveis por gerar alta produção de ERO (WU, D.; YOTNDA, P., 2011). Apesar de ERO terem meia-vida curta, é importante a detecção e análise em estudos básicos, pré-clínicos e clínicos.

Células tumorais produzem maiores níveis de ERO quando comparadas a células normais. Assim, como uma célula normal, a célula cancerígena também possui um sistema antioxidante, que reduzem as ERO para níveis toleráveis (CHEN, Y. et al., 2008). A produção mitocondrial de ERO pode desempenhar seu papel na morte celular por causar permeabilidade mitocondrial e alterar o potencial de membrana (CHEN, T.C. et al., 2009).

Quando as espécies reativas são formadas, o sistema antioxidante enzimático é responsável por manter o nível fisiológico. Este sistema inclui as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx) e peroxiredoxinas, que atuam diretamente na redução oxidativa. A enzima SOD é responsável por capturar o superóxido (O_2^-) transformando-o em peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) (SIES, H.; BERNDT, C.; JONES, D.P., 2017), enquanto a CAT e GPx convertem o peróxido de hidrogênio em oxigênio e água (WEYDERT, C.J.; CULLEN, J.J., 2010). A ação das enzimas CAT e GPx é de grande importância, uma vez que o H_2O_2 , por meio das

reações de Fenton e Haber -Weiss, mediante a participação dos metais ferro e cobre, culmina na geração do radical $\text{OH}\cdot$ contra o qual não há sistema enzimático de defesa (SCHNEIDER, C.D.; OLIVEIRA, A.R., 2004). Ainda, a redução na atividade da catalase pode aumentar as concentrações de peróxido de hidrogênio, que é responsável pela oxidação lipídica (FIRUZI, O. et al, 2006).

O sistema antioxidante impede a geração endógena de oxidantes, impedindo a formação de dano oxidativo a biomoléculas, inclusive dano a nucleobases de DNA e RNA (DALLE-DONNE, I. et al., 2006; AHMED, T. et al., 2015; SIES, H.; BERNDT, C.; JONES, D.P., 2017). Deste modo, este sistema desenvolvido pelos seres aeróbios é o responsável pela proteção da célula dos efeitos oxidativos das ERO (LÓPEZ, A. et al., 2012).

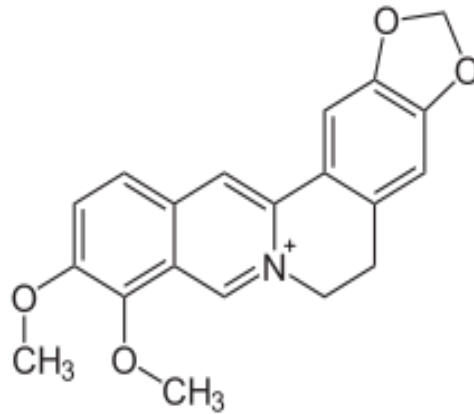
A lipoperoxidação forma muitos produtos secundários, entre eles o malondialdeído (MDA) (URSO, M.L.; CLARKSON, P.M., 2003). Além disso, as ERO podem modificar a conformação química inicial dos ácidos graxos poli-insaturados e, conseqüentemente, alterar a coesão, fluidez, permeabilidade e funções metabólicas das células (LIOCHEV, S.I., 2013).

Quando a oxidação ocorre em proteínas, produz derivados carbonilados, resultado da oxidação das cadeias laterais de diversos aminoácidos (DALLE-DONNE, I. et al., 2006). Os marcadores de oxidação protéica incluem os grupos tióis protéicos e os grupos carbonilas plasmáticos (JACKSON, M.J., 1999; FIRUZI, O. et al, 2006), sendo que os carbonilados plasmáticos consistem nos de maior relevância (VINCENT, H.K.; INNES, K.E.; VINCENT, K.R., 2007).

3.4 BERBERINA

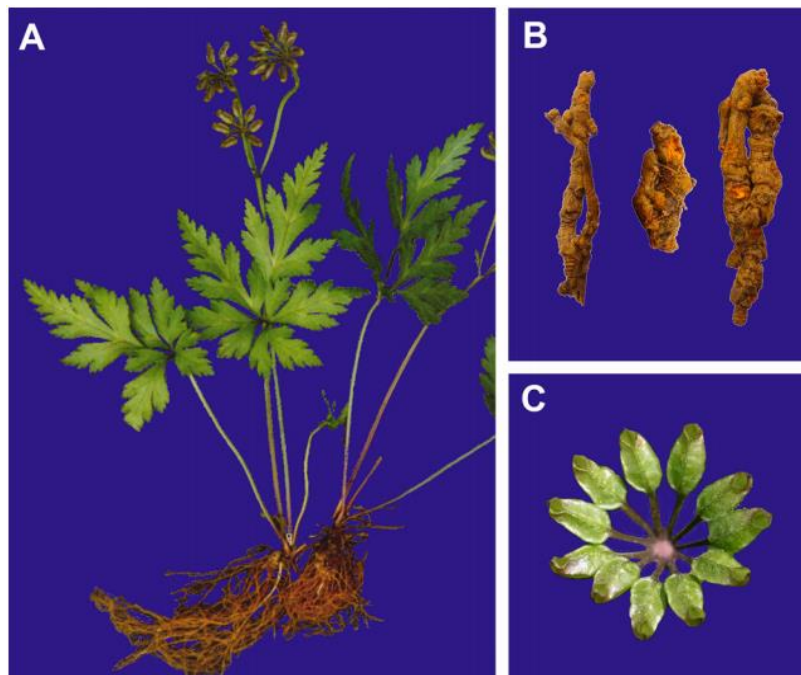
A Berberina (BBR), 5,6-dihydro-9,10-dimethoxy-benzo (g)-1,3-benzodioxolo(5, 6-a) quinolizinium-, chloride (Figura 3), um alcalóide isoquinolina, é um composto encontrado em diversas plantas medicinais como *Hydrastis canadensis*, *Coptis chinensis*, *Berberis aquifolium*, *Berberis vulgaris* e *Berberis aristata*. A BBR pode ser extraída de raízes, rizomas e cascas do caule destas plantas (Figura 4) (CHEN, X.W. et al., 2012).

Figura 3: Estrutura química da Berberina



Fonte: Adaptado de AHMED, T. et al., 2015

Figura 4: A: *Coptis chinensis*; B: rizoma seco; C: carpelos.



Fonte: Adaptado de XIANG, K. et al., 2016

A BBR tem sido estudada em diversas doenças, incluindo hiperlipidemia, diabetes melito, síndrome do ovário policístico, obesidade, doença hepática gordurosa,

doença arterial coronariana, gastroenterite, dor e diarreia, e tendo propriedades antimicrobianas, antidiabéticas e anti-inflamatórias, demonstrando um amplo espectro de aplicações clínicas (TILLHON, M. et al., 2012). A BBR demonstrou proteger células mensequimais da apoptose induzida por hipóxia, e no trauma cerebral induzido, a BBR foi capaz de reduzir o dano cerebral e edema, demonstrando uma ação neuroprotetora (ZHANG, W. et al., 2009; CHEN, C.C. et al., 2014).

Um fato de grande importância observado na utilização da BBR, é a capacidade de ultrapassar a barreira hematoencefálica, visto que, assim pode desempenhar efeitos farmacológicos no encéfalo (TAN, X. et al., 2013). Demonstra ainda, propriedades antitumorais, interferindo em características da tumorigênese e desenvolvimento do tumor, inibindo a proliferação celular e a indução da parada do ciclo celular nas fases G1 ou G2, e início da apoptose, também, ativa a proteína quinase ativada por AMP (AMPK) que regula vias metabólicas (JIANG, S.X. et al., 2017).

A BBR aumentou a produção de ERO em células de câncer de mama, MCF-7 and MDA-MB-23 (XIE, J. et al., 2015). Alterou o potencial de membrana mitocondrial, essas alterações podem estimular a produção de ERO e a liberação do citocromo c, desencadeando a apoptose nas células cancerosas. Ainda, ela foi capaz de interagir com ácidos nucleicos, proteínas, incluindo telomerase e topoisomerase, p53, NF-Kb, MMPs, e receptores de estrogênio cancerosos (TILLHON, M. et al., 2012). Meeran, S.M. et al. (2008), observou em seu estudo que o tratamento com BBR em células de câncer de próstata induziu a geração de ERO, mas não induziu a geração em células epiteliais normais de próstata, e o aumento de ERO nas células tumorais foi acompanhado de apoptose.

Em um estudo com carcinoma hepático avançado, a berberina mostrou diminuir a viabilidade celular de modo dependente da concentração em comparação com hepatócitos normais. A berberina aumentou a ativação de AMPK, e este aumento foi acompanhado por efeitos apoptóticos, que ocorreram de modo dependente de caspase através da via mitocondrial que foi acoplada com a liberação do citocromo c, ativação das caspases 9 e 3, e ainda aumentou a proporção de Bax/Bcl-2 de forma dependente da concentração (YANG, X.; HUANG, N., 2013).

A berberina ainda possui a capacidade de formar complexos tanto com DNA e RNA, gerando danos (ORTIZ, L.M. et al., 2014-b). Um estudo com osteossarcoma

demostrou que a berberina foi capaz de causar a fragmentação do DNA das células cancerosas (ZHU, Y. et al., 2014). E em outra pesquisa, foi observado que a BBR pode causar dano ao DNA por meio da produção de ERO (CHEN, T.C. et al., 2009).

4 MANUSCRITO CIENTÍFICO

A metodologia, os resultados, discussão e referências desta dissertação apresentam-se sob a forma de um manuscrito científico e representa a íntegra deste estudo. O manuscrito encontra-se nas normas da revista Apoptosis.

As referências citadas ao final da dissertação referem-se somente às citações que aparecem nos itens INTRODUÇÃO e REVISÃO DE LITERATURA desta dissertação.

**ANTITUMORAL MECHANISM OF BERBERINE IN GLIOBLASTOMA
MULTIFORME U87MG CELLS**

Taís Vidal Palma^a, Micheli Mainardi Pillat^b, Luana Suéling Lenz^a, Nathiele Bianchin Bottari^c, Aline Pereira^c, Maria Rosa Chitolina Schetinger^c, Vera Maria Morsch^c, Henning Ulrich^b, Cinthia Melazzo de Andrade*.

^a Postgraduate Program in Biological Sciences: Biochemistry Toxicology, Biochemistry and Oxidative Stress Section of the Therapy Laboratory Cellular, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

^b Department of Biochemistry, Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo-SP, Brazil.

^c Postgraduate Program in Biological Sciences: Biochemistry Toxicological, Department of Chemistry, Center for Natural and Exact Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil.

* To whom correspondence should be addressed: Cinthia Melazzo de Andrade, Ph.D. Department of Small Animal Clinic, Center of Rural Sciences Federal University of Santa Maria-RS, Room 121, Veterinary Hospital Building, Avenue Roraima n° 1000, Santa Maria, RS 97105900, Brazil. Fax number: +55-55-3220-8814; cmelazzo1@gmail.com

Abstract

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most prevalent tumor among gliomas and presents the highest mortality rate among brain tumors. Berberine (BBR) is an alkaloid isoquinoline found in medicinal plants such as *Coptis chinensis*. Studies have been showed that BBR presents protective activity in mesenchymal cells and neurons, and antitumor properties in breast cancer and hepatocarcinoma. The aim of this study was to investigate the antitumor effects of BBR in GBM U87MG cells, as well as to identify, whether such effects are mediated by oxidative stress and canonical apoptotic pathways. After treatment with several concentrations of BBR (10, 25, 100 and 250 μ M) for 24, 48 and 72 hours of exposure, BBR inhibited cell viability of U87MG cells in a concentration- and time-dependent manner. Afterwards, it was observed that BBR, starting at a concentration of 25 μ M of 24h exposure, significantly suppressed proliferation and increased early apoptosis (53.5% \pm 11.15 of annexin V⁺ propidium iodide⁻ cells) compared to untreated cells (7.5% \pm 4.6). BBR-induced apoptosis was independent from AMPK activity and did not change total caspase-3 and p-p53 levels. Moreover, BBR (25 μ M / 24h) increased oxidative stress in U87MG cells, evidenced by high levels of reactive oxygen species, thiobarbituric acid reactive substance and protein carbonylation. Considering the antitumor effects of BBR in U87MG cells, this compound may be a potential candidate for adjuvant GBM treatment.

Keywords:

Glioma; Apoptosis; Oxidative stress; phytotherapy; ROS; AMPK.

Introduction

Glioblastoma multiforme (GBM) is a grade IV tumor and divided into glioblastoma IDH-wildtype (Isocitrate dehydrogenase- IDH) (90% of cases) and glioblastoma IDH-mutant (10%) (WHO, 2016). Glioblastomas IDH-wildtype is defined as primary tumor and predominates in patients older than 55 years, the IDH-mutant corresponds to secondary glioblastoma with a history of diffuse glioma and, preferably, appears in treatment is challenging due to its highly invasive and heterogeneous nature [2].

Phytochemicals have been studied as chemo-preventive and -therapeutic agents against various types of cancer [3]. Berberine (BBR), 5,6-dihydro-9,10-dimethoxybenzo (g) -1,3-benzodioxolo (5,6-a) quinolinium, chloride, an alkaloid isoquinoline, can be obtained from medicinal plants, such as *Hydrastis canadensis*, *Coptis chinensis*, *Berberis aquifolium*, *Berberis vulgaris* and *Berberis aristata* [4]. BBR has anti-inflammatory and antioxidant effects [5], as well as antiangiogenic, apoptotic actions and inhibitory effects on migration and proliferation [3].

The BBR increases the production of reactive oxygen species (ROS) in human pancreatic PANC-1 and MIA-PaCa2 cancer cell lines, facilitating apoptosis [6]. Interestingly, in colorectal cancer, BBR activates AMP-activated protein kinase (AMPK). Moreover, phosphorylation of p53 and caspase-3 expression depended on AMPK activation, suggesting that BBR has cytotoxic effect against colorectal cancer by interfering with the AMPK pathways [7]. However, molecular effects and underlying mechanisms triggered by berberine in human glioblastoma cell line U87Mg need yet to be explored.

Materials and methods

Preparation of the berberine solution

A solution of 100 mM Berberine Chloride (Sigma-Aldrich), diluted in DMSO, was prepared to be used at different concentrations: 10, 25, 100 and 250 μ M.

Cell line and cell culture

U87MG cells were maintained in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Life Technologies) culture medium plus 100 IU / ml penicillin, 100 μ g / ml streptomycin and 10% fetal bovine serum (FBS). The cells were plated in plastic culture bottles (25cm²)

and incubated in an cell culture incubator at 37°C, 5% CO₂ atmosphere and 95% humidity.

Cell viability by MTT assay

Cell viability was determined using the colorimetric analysis method by the MTT assay [3- (4, 5-dimethyl-2-thiazolyl) -2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide] salt [8]. Cells were cultured in a 96-well plate (2×10^4 cells / ml) overnight, in 200 μ L culture medium at 37°C and 5% CO₂ at the temperature. After that, cells were treated with BBR at different concentrations (10, 25, 100, and 250 μ M), and incubated in a CO₂ incubator at 37 ° C for 24, 48 and 72 hours. After the incubation period, 200 μ L of the medium was withdrawn, and 40 μ L of MTT (5 mg / mL solution; Life Technologies) was added to each well. After 1 hour of incubation at 37 ° C and 5% CO₂, the MTT solution was withdrawn and 120 μ L / well of DMSO was added for solubilization of the formazan salts. Absorbance measurements were performed in a spectrophotometer at 570 nm.

Trypan Blue test

After treatment with berberine, as described in previous section, Trypan Blue staining was used for cell counting. The dye has the ability to penetrate cells whose membrane is ruptured, blushing the cells that are not viable. Cell counting was done with a Neubauer's chamber.

Cell cycle determination

U87MG cells were cultured in 6-well plates (2×10^4 cells / well). After the treatment with BBR, supernatants were discarded, and the cells were washed with PBS and removed from the wells with a trypsin / EDTA solution (0.2% / 0.02%), leaving the solution to act for 5 minutes in a cell culture incubator. The action of the trypsin was neutralized with the addition of medium with 10% fetal bovine serum. Subsequently, the cells were centrifuged, the supernatant discarded, and the cells were then fixed and permeabilized by adding 75% ice-cold ethanol. After that, cells were centrifuged and the pellet was resuspended with 500 μ L of DNA-staining solution with PBS (0,1% Triton, 0,5% Tween, 10 μ g/ml Propidium iodide). The tubes were incubated for 1 hour and analyzed in a flow cytometer.

Evaluation of apoptosis: Quantification of Annexin, Propidium Iodide, Caspase-3 and phospho-p53 by flow cytometry.

For the evaluation of the induction of apoptosis by BBR in U87MG cells, as well as its signaling pathways, cells cultured in 6-well plates (2×10^4 cells / well) were used. For the evaluation, if the pathway of induction of apoptosis is through AMPK, an inhibitor

of this kinase, Compound C (10 μ M), was used alone or together with the BBR treatment.

After the treatment period, the supernatant was discarded, the cells were washed with PBS and removed from the wells with a trypsin / EDTA solution (0.2% / 0.02%). The action of the trypsin was neutralized with the addition of medium with 10% SFB. Subsequently, cells were centrifuged, supernatants discarded, and cell pellets were resuspended with 200 μ L of binding buffer (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂ and 1 μ L Annexin-V; Life Technologies). The tubes were incubated on ice for 30 minutes, plus propidium iodide and immediately analyzed in a flow cytometer.

To quantify total caspase-3 and phospho-p53, other samples of individualized cells in suspension were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS for 20 minutes. Sequentially, the samples were incubated in PBS containing 3% FBS to block non-specific sites and 0.1% Triton X-100 to permeabilize the cell membranes for 20 minutes. Subsequently, the cells were incubated in the same solution with the primary anti-phospho-p53 rabbit (Sigma-Aldrich) and anti-caspase 3 rabbit (Sigma-Aldrich) at the dilutions indicated by the manufacturer. After 30 minutes of incubation with primary antibody at room temperature, the cells were washed with PBS and incubated again for 30 minutes with the secondary fluorophore-conjugated antibodies (Alexa Fluor 488). Finally, the cells were washed and resuspended in 500 μ L of PBS for data acquisition in the flow cytometer, with at least 30,000 events being acquired per sample.

Catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) activity

CAT activity was determined in U87MG cells by the decomposition of H₂O₂ at 240 nm according to a method described by Aebi [9]. Activity was quantified according to Spitz and Oberley [10], by spectrophotometrically determining the inhibition of auto-oxidation of epinephrine to adrenochrome at an alkaline pH at 480 nm in U87MG cells. For the SOD assay, 10–40 μ g of protein was used, whereas CAT activity was determined using 10–40 μ g protein. The results were expressed in η moles/mg of protein relative to untreated control. Protein concentrations were determined according to Bradford [11].

Glutathione peroxidase (GPx) activity

GPx activity was determined using U87MG cells, glutathione reductase and NADPH. The method is based on the oxidation of NADPH, which is indicated by a decrease in absorbance at 340 nm [12]. The enzymatic activity was expressed as η mol/h/mg of

protein relative to untreated control. Protein concentrations were determined according to Bradford [11].

Diclorofluoresceine (DCFH) levels

2'-7'-Dichlorofluorescein (DCFH) levels were determined as an index of the peroxide production by the cellular components. This experimental method of analysis is based on the deacetylation of the probe DCFH-DA, and its subsequent oxidation by reactive species to DCFH, a highly fluorescent compound [13]. The U87MG cells (10 μ l) were added to a medium containing Tris-HCl buffer (10 mM; pH 7.4) and DCFH-DA (1 mM). After DCFH-DA addition, the medium was incubated in the dark for 1 h until the start of fluorescence measurement procedure (excitation at 488 nm and emission at 525 nm, and both slit widths were used at 1.5 nm).

Thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) level

The lipid peroxidation was estimated by measuring TBARS, and expressed in terms of malondialdehyde (MDA) content. In this method, MDA, an end product of fatty acid peroxidation, reacts with TBA to form a colored complex. The U87MG cells (200 μ l) were incubated at 95°C for 60 min in acid medium containing 8.1% sodium dodecyl sulfate, 0.5 ml of acetic acid buffer (500 mM, pH 3.4) and 0.6% TBA. TBARS levels were measured at 532 nm, and the absorbance was compared with the standard curve using malondialdehyde according to the method of Jentzsch [14].

Carbonylation protein level

Carbonylation of proteins was measured according to the Levine method [15], measured by the formation of hydrazone protein derivatives, using 2,4-dinitrophenylhydrazide (DNPH). The U87MG cells were diluted in PBS containing 10 mM sodium phosphate, pH 7.4, and 0.14 M NaCl. For precipitation, cold trichloroacetic acid (TCA, 10%) was used. After that, a solution of 10 mM DNPH in 2 M HCl was added to the sample protein granule and only 2 M HCl was added to the corresponding crude portions of aliquot reagents from the sample. Samples were incubated in the dark, room temperature, for 30 minutes. The reaction was stopped with 10% TCA and the protein granules were washed twice with ethanol / ethyl acetate (1: 1). Samples were resuspended in 2% SDS buffer denaturation. The carbonyl contents were determined by absorbance measurements at 370 nm.

Statistical analysis

Data were analyzed with the Student's t-test, one or two-way ANOVA, followed by Tukey post-hoc test. Differences between mean values were considered significant at

$p \leq 0.05$. Data are shown as mean \pm SD, representative for three independent experiments.

Results

BBR decreases viability/proliferation of U87MG cells

In this study, in order to obtain a cytotoxic dose-response curve and to identify the lowest concentration able of reaching the cytotoxicity plateau of the compound, several concentrations of BBR were used (10, 25, 100 and 250 μ M) and the samples were analyzed by the MTT assay. Some concentrations of BBR (Fig. 1a) were able to decrease cell viability, however, only the concentrations of 100 and 250 μ M had a significant decrease in 24 hours. It was also evaluated, whether in the period of 48 and 72 hours BBR-induced effects on cell viability remain (Fig. 1b). Interestingly, we observed that cell viability continues to decline at all concentrations as a function of time compared to control. Taken together, it was observed that BBR inhibited cell viability/proliferation of U87MG cells in a concentration- and time-dependent manner ($P < 0.05$).

BBR induces cell death in U87MG cells *in vitro*

To examine, whether BBR-induced inhibition of cell viability of U87MG GM cancer cells could be associated with the induction of death cell, we analyzed the death rates of U87MG cells by trypan blue assay. For this, the cells were treated with various concentrations of BBR (10, 25, 100 or 250 μ M) for 24 h. Thus, it can be seen in Fig. 1d, that BBR induced death cell of U87MG cells in a dose-dependent manner ($P < 0.05$).

BBR induces an accumulation of cells in G₁-phase of the cell cycle in U87MG cells

To determine, whether BBR might influence iproliferation of U87MG, frequencies (%) of cells in different phases of the cell cycle were examined by flow cytometry. Both concentrations of 25 μ M and 100 μ M (24h of treatment) significantly increased the proportion of cells in the G₁-phase, and decreased percentages of cells in G₂/M-phase compared to untreated controls. Percentages of cells in S-phase did not change.

BBR induces apoptotic death in U87MG cells independent from AMPK activity

In the evaluation of apoptosis-like cell death, using Annexin V and Propidium Iodide (PI) as a marker, 24 h-BBR treatment (25 and 100 μ M) in U87MG cells promoted early

apoptosis (Annexin⁺/PI⁻ cells) compared to control samples. When evaluated the late apoptosis (Annexin⁺/PI⁺ cells) no increase was observed.

It is known that BBR promotes phosphorylation of AMPK, and this could be a mechanism that determines its antitumoral activity [16]. Thus, an AMPK inhibitor (Comp. C), at a concentration of 10 μ M, did not evoke changes in the induction of apoptosis.

Antitumoral activity of BBR does not change p-p53 and caspase-3 levels

To evaluate whether BBR-induced apoptosis involves total caspase-3 and p-p53 expression in U87MG cells, we tested whether BBR is able to induce p53 phosphorylation and to increase concentration of total caspase-3. Moreover, we tested whether BBR is able to induce these effects even when the AMPK is blocked. As it shown in Fig. 3, neither treatment with BBR nor co-treatment with Compound C (AMPK inhibitor) significantly altered the levels of phospho-p53 and caspase-3.

Effects of BBR on antioxidant enzymes and oxidative stress

Since BBR at a concentration of 25 μ M for 24 h presented a significant increase on early apoptosis, we decided to evaluate the antioxidant enzymes in this concentration and time of treatment. In Fig. 4, we observed a significant increase in catalase and superoxide dismutase activities, while glutathione peroxidase activity was not enhanced.

BBR perturbed oxidative homeostasis, as shown following treatment of cells for 24 h with BBR 25 μ M. ROS, TBARS and carbonylation rates revealed significant increases following BBR treatment (Fig. 4).

Discussion

BBR is an alkaloid compound, widely used in traditional Chinese medicine in diseases, such as dysentery, diarrhea, stomatitis [17]. BBR has also been described as anticancer agent capable of decreasing cell viability and inducing apoptosis [18, 19, 20]. In our study, it was observed that BBR decreases cell viability of a human GBM cell line in a concentration- and time-dependent manner. Moreover, BBR (25 μ M) treatment for 24 h suppressed proliferation and strongly induced apoptosis and oxidative stress in this cancer cells.

BBR reduces cell viability in a concentration and time-dependent manner in breast, liver, colon cancer cells [21] and osteosarcoma [22]. These results are in

agreement with our findings, showing that higher concentration and incubation time induce greater effects in a human GBM cell line. Interestingly, studies have been demonstrated that BBR does not induce cytotoxic effects in non-cancer cells [18, 21]. In fact, BBR is not cytotoxic on human bronchial epithelial cells [18] and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) at concentrations from 20- 100 $\mu\text{g} / \text{mL}$ [21]. These data suggest that BBR could be safe for *in vivo* administration.

Studies in human cholangiocarcinoma [23], breast [24] and pancreatic [6] cancer have shown that BBR induces G₁-phase cell cycle arrest. When we analyzed the cell cycle in BBR-treated U87MG cells, we observed an increase of the cells in the G₁-phase, together with the reduction in the cells in G₂/M-phases. As expected, in PANC-1 (15 mM- 72h) and MIA-PaCa2 (10 mM-72h) pancreatic cancer cells, BBR also augments the percentage of cells in the G₁-phase, and this result is accompanied by an increase in the apoptosis. These data suggest that the accumulation of cell in G₁-phase is associated with BBR-induced apoptosis [6]. Therefore, our findings showing that BBR induces accumulation of cells in G₁-phase and apoptosis in a human glioblastoma multiforme cell line, are in line with previous studies with other cancer cells. In fact, we observed that BBR, starting at a low concentration of 25 μM and 24 h exposure to GBM cells, induces strong early apoptosis (53.5% \pm 11.15 of annexin V⁺ propidium iodide⁻ cells).

AMP-activated kinase (AMPK) is described as a "fuel gauge" in the cell, and is activated by increasing AMP + ADP / ATP, a condition that often signals cell stress. BBR is reported as a potential activator of AMPK. One target of AMPK is p53, which can influence cancer risk and progression [25]. In our analysis, we found that BBR demonstrates a tendency to induce p53 phosphorylation, but when AMPK was inhibited, p53 phosphorylation did not change. This evidences that p53 activation is not AMPK-dependent in glioblastoma U87MG cells.

BBR was also able to induce apoptosis in HepG2 cells, and these events were accompanied by activation of AMPK and caspase-3. When AMPK was inhibited by Compound C, both apoptosis and caspase-3 cleavage were also inhibited, showing that this kinase is involved in BBR-induced cytotoxicity in HepG2 cells [26]. However, in our study, BBR-induced apoptosis in GBM cells did not depend on AMPK activation. Additionally, neither Compound C nor BBR interfered with total caspase-3 content.

The BBR increases the production of ROS in human pancreatic cancer PANC-1 and MIA-PaCa2 cells [6], alters the mitochondrial membrane potential, these

alterations can stimulate the ROS and the release of cytochrome C, triggering apoptosis in cancer cells [27]. ROS are generated in several metabolic processes, and can react with various intracellular targets, such as lipids, proteins and DNA. Since ROS are generated under normal cellular conditions, the biological effects are determined by their intracellular concentration [28]. Our results demonstrated high concentrations of ROS and cell damage markers (MDA and carbonyl proteins) in glioblastoma U87MG cells treated with BBR. These findings may be linked to the increased induction of apoptosis, since free radicals destroy the cell membrane, release cytochrome C and activate apoptosis. Similarly, in the study by Xie et al. [29], both MCF-7 and MDA-MB-231 cells increased ROS levels upon BBR treatment, together with altered mitochondrial membrane potential.

Once reactive species are formed, the endogenous enzyme system attempts to maintain them at a physiological level. This category includes SOD, catalase, and glutathione peroxidases. The enzyme SOD is responsible for capturing superoxide (O_2^-) by converting it into hydrogen peroxide (H_2O_2) [30], while CAT and GPx convert hydrogen peroxide into oxygen and water [28]. In our study, the activity of the SOD and CAT enzymes were increased in BBR-treated cells compared to untreated cells; however, this elevation was not sufficient to normalize the levels of ROS, MDA and carbonyl proteins.

In conclusion, this study suggests positive effects of BBR in the decrease of viability by promoting via apoptosis in U87MG cells. In addition, the analysis showed that BBR treatment increased apoptosis, and this event was accompanied by increased oxidative stress and cell arrest in G_1 phase. However, BBR did not affect p53 phosphorylation and total caspase 3 expression rates and did not induce apoptosis via AMPK activation. In summary, BBR may be a potential candidate for GBM adjuvant treatment, due to its potential of promoting apoptosis of GBM tumors.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and the

Federal University of Santa Maria, Brazil. H.U. acknowledges grant support from the São Paulo State Foundation FAPESP (project No. 2012/50880-4), Brazil. M.M.P. is grateful for a postdoctoral fellowship from FAPESP (project No 2015/19478-3).

References

- 1- Louis DN et al. (2016) The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica*. 131(6): 803-820.
- 2- Yulyana Y et al. (2016) Redox-Active Mn Porphyrin-based Potent SOD Mimic, MnTnBuOE-2-PyP (5+), Enhances Carbenoxolone-Mediated TRAIL- Induced Apoptosis in Glioblastoma Multiforme. *Stem Cell Reviews and Reports*. 12(1): 140-155.
- 3- Barzegar E et al. (2015) Effects of berberine on proliferation, cell cycle distribution and apoptosis of human breast cancer T47D and MCF7 cell lines. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 18(4): 334-342.
- 4- Chen XW et al. (2012) Interaction of herbal compounds with biological targets: A case study with berberine. *Scientific World Journal*. 2012: 708292(31).
- 5- Ortiz LM et al. (2014) Multiple Effects of Berberine Derivatives on Colon Cancer Cells. *BioMed Research International*. 47(10): 824-833.
- 6- Park SH et al. (2015) Berberine induces apoptosis via ROS generation in PANC-1 and MIA-PaCa2 pancreatic cell lines. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 48(2): 111–119.
- 7- Li W et al. (2015) Berberine regulates AMP activated protein kinase signaling pathways and inhibits colon tumorigenesis in mice. *Molecular Carcinogenesis*. 54(10): 1096-1109.
- 8- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 65: 55-63.
- 9- Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*. 105: 121-126.
- 10- Spitz DR, Oberley LW (1989) Na assay for superoxide dismutase activity in mammalian tissue homogenates. *Analytical Biochemistry*. 179(1): 8-18.
- 11- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248–254.

- 12- Paglia DE, Valentine WN (1967) Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocytes glutathione peroxidase. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 70(1): 158- 169.
- 13- Halliwell B, Gutteridge JMC (2007) *Free radicals in biology and medicine*, 4th edn. Oxford University Press, New York.
- 14- Jentsch AM et al. (1996) Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radical & Medicine*. 20(2): 251-256.
- 15- Levine RL et al. (1990) Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymology*. 186: 464-478.
- 17- Liu CS et al. (2016) Research progress on berberine with a special focus on its oral bioavailability. *Fitoterapia*. 109: 274–282.
- 18- Qi HW et al. (2014) Epithelial-to-mesenchymal transition markers to predict response of Berberine in suppressing lung cancer invasion and metastasis. *Journal of Translational Medicine*. 24: 12-22.
- 19- Liu CH et al. (2015) Berberine Inhibits the Metastatic Ability of Prostate Cancer Cells by Suppressing Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT)-Associated Genes with Predictive and Prognostic Relevance. *International Journal of Medical Sciences* 12(1): 3-71.
- 20- Ma W et al. (2017) Berberine inhibits the proliferation and migration of breast cancer ZR-75-30 cells by targeting Ephrin-B2. *Phytomedicine*. 25: 45-51.
- 21- El-Wahab AEA et al. (2013) In vitro biological assessment of berberis vulgaris and its active constituent, berberine: antioxidants, anti-acetylcholinesterase, anti-diabetic and anticancer effects. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 13: 218(13).
- 22- Zhu Y et al. (2014) Berberine induces apoptosis and DNA damage in MG-63 human osteosarcoma cells. *Molecular Medicine Reports*. 10(4): 1734–1738.
- 23- He W et al. (2012) Berberine Inhibits Growth and Induces G1 Arrest and Apoptosis in Human Cholangiocarcinoma QBC939 Cells. *Journal of Pharmacological Sciences*. 119(4): 341-348.
- 24- Kim JB et al. (2010) The alkaloid Berberine inhibits the growth of Anoikis-resistant MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines by inducing cell cycle arrest. *Phytomedicine*. 17(6): 436-440.
- 25- McCarty MF (2014) AMPK activation--protean potential for boosting healthspan. *Age (Dordr)*. 36(2): 641-663.
- 26- Yu R et al. (2014) Berberine-induced apoptotic and autophagic of HepG2 cells requires AMPK activation. *Cancer Cell International*. 14: 49.

27- Tillhon M et al. (2012) Berberine: New perspectives for old remedies. *Biochemical Pharmacology*. 84(10): 1260-1267.

28- Weydert CJ, Cullen JJ. (2010) Measurement of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nature Protocols*. 5(1): 51-66.

29- Xie J et al. (2015) Berberine- induced apoptosis in human breast cancer cells is mediated by reactive oxygen species generation and mitochondrial-related apoptotic pathway. *Tumor Biology*. 36(2): 1279-1288.

30- Sies H, Berndt C, Jones DP (2017) Oxidative Stress. *Annual Review of Biochemistry*. 86: 715-748.

Legends

Fig. 1 Decreased U87MG cell viability following exposure to berberine (BBR) in U87MG cells. Cells were incubated with increasing concentrations of BBR (10, 25, 100 or 250 μ M). (a) MTT assay after 24h, and (b) 72h of treatment. (c) Trypan Blue assay: Microscopic images following 24h of exposure to BBR, (d) Percentages of cells subjected to cell death. Data are shown as mean \pm SD, representative for three independent experiment, * $p < 0.05$

Fig. 2 (a) Effects of 24h treatment with BBR on cell cycle progression of U87MG cells. (b) Effects of 24h-BBR (25 and 100 μ M) treatment and AMPK blockade by 10 μ M Comp. C on apoptosis of U87MG cells. (c) Apoptosis was assessed by measuring annexin V⁺ cells by flow cytometry techniques. Data are shown as mean \pm SD, representative for three independent experiment, * $p < 0.05$.

Fig. 3 Effects of 24h-BBR treatment (100 μ M) and of AMPK blockade blockage by Comp. C (10 μ M) on phosphorylation of p53 and caspase 3 levels in U87MG cells. (a) p-p53⁺ cells were quantified by flow cytometry techniques. (b) Mean values \pm SD of p-p53⁺ cells. (c) Caspase 3⁺ cells quantified by flow cytometry techniques (d) Mean values \pm SD of caspase 3⁺ cells. Data are shown as mean \pm SD, representative for three independent experiment, * $p < 0.05$.

Fig. 4 Changes of antioxidative parameters and oxidative status of U87MG cells following chronic exposure to BBR. Cells were treated with BBR (25 μ M) for 24hs. (a) SOD, (b) CAT and (c) GPx activity relative to untreated controls; (d) ROS, (e) TBARS and (f) Carbonyl levels relative to untreated controls. Data are shown as mean \pm SD, representative for three independent experiment, * $p < 0.05$.

Figures

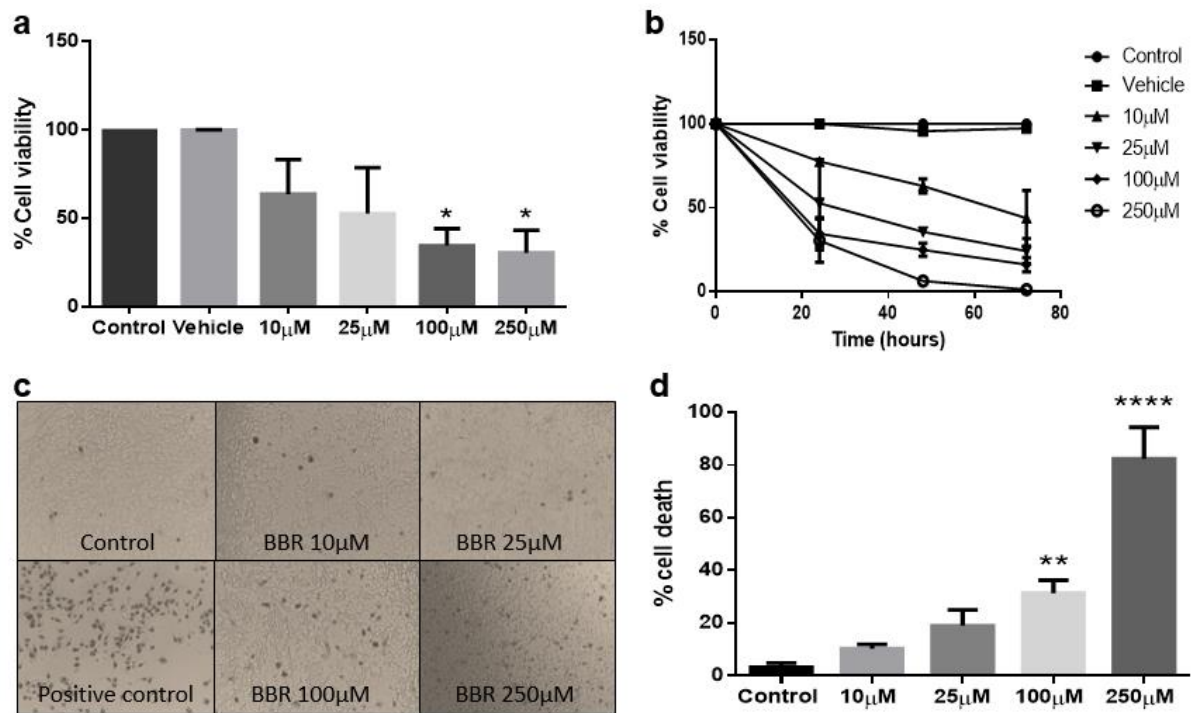


Fig. 1

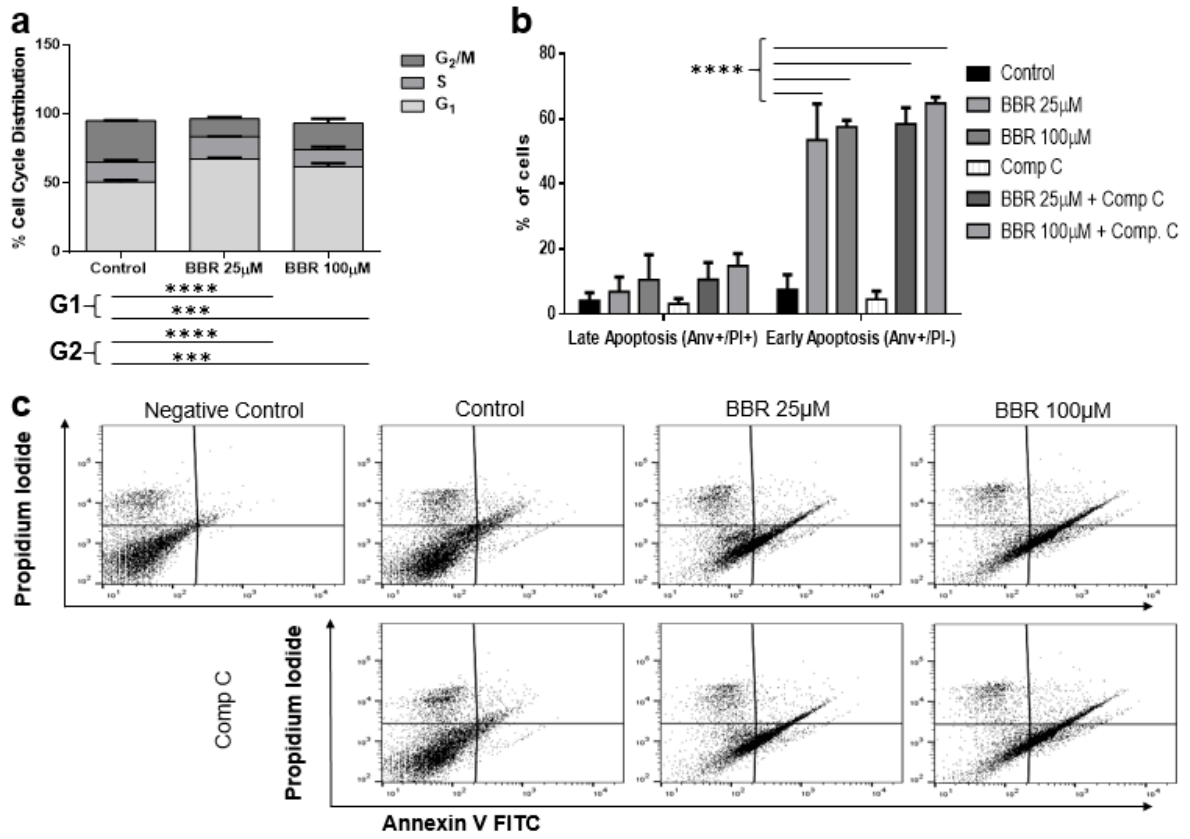


Fig. 2

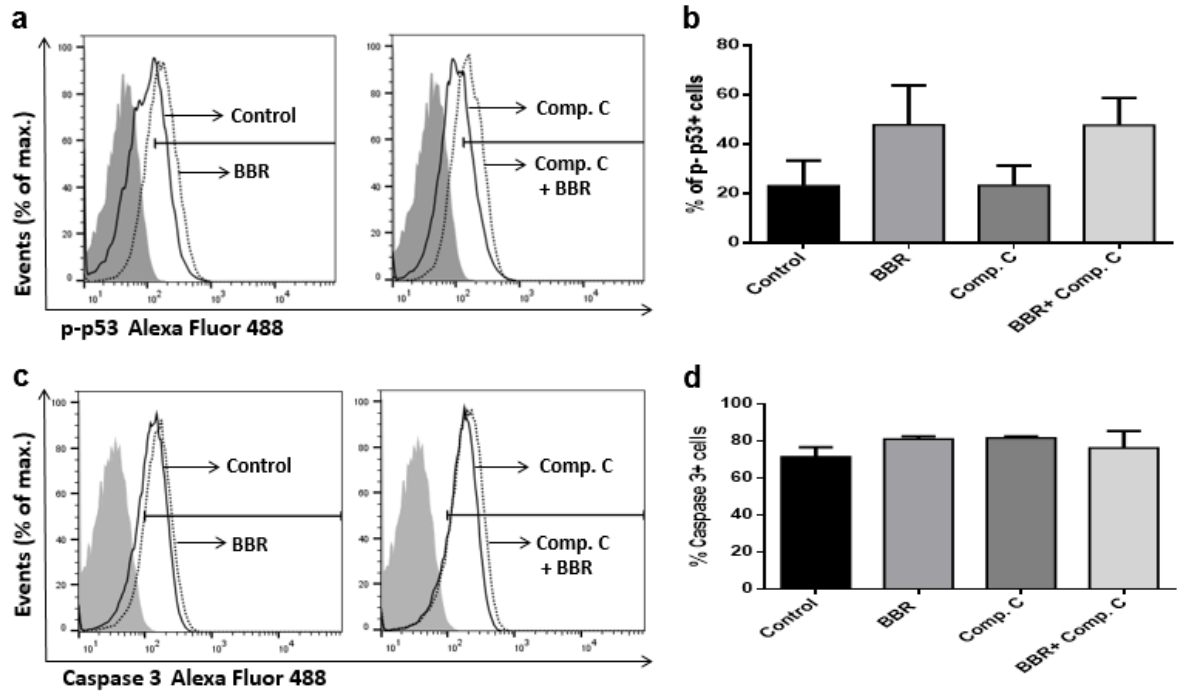


Fig. 3

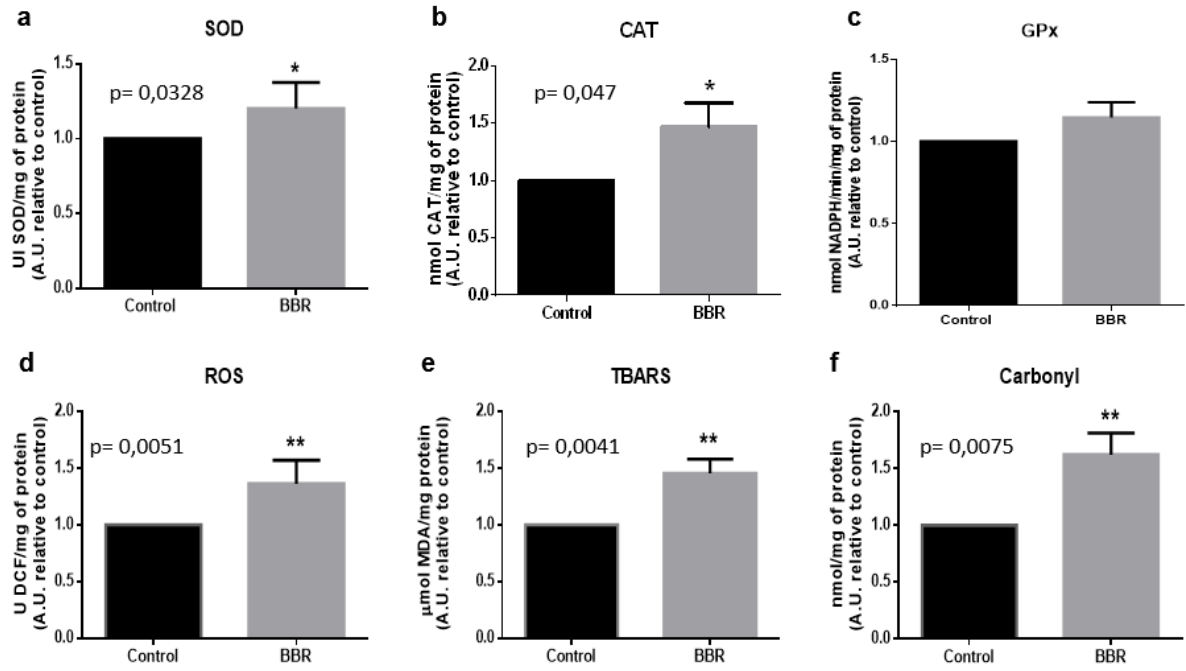


Fig. 4

5 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos pode-se observar que a BBR teve efeitos positivos na diminuição da viabilidade celular, e no aumento na morte das células U87MG de GBM humano, demonstrando que esta morte celular é do tipo apoptose. O tratamento com a BBR aumentou a apoptose e esse evento foi acompanhado por aumento do estresse oxidativo e parada das células na fase G1 do ciclo celular.

Os resultados encontrados são de grande importância, uma vez que os tratamentos atuais para o GBM não são capazes de eliminar o tumor por completo. Dessa maneira, sugere-se que a BBR pode ser um potencial candidato para o tratamento adjuvante de GBM, tendo demonstrado ação apoptótica neste tumor.

6 REFERÊNCIAS

ADMS, J.M. and CORY, S. Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. **Current Opinion in Immunology**. v. 19(5), p. 488-96, 2007.

AHMED, T. et al. Berberine and neurodegeneration: A review of literature. **Pharmacology Reports**. v. 67(5), p. 970-979, 2015.

BARZEGAR, E. et al. Effects of berberine on proliferation, cell cycle distribution and apoptosis of human breast cancer T47D and MCF7 cell lines. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**.v. 18(4), p. 334-342, 2015.

GOLDAR, S. et al. Molecular Mechanisms of Apoptosis and Roles in Cancer Development and Treatment. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**. v. 16(6), p. 2129-2144, 2015.

BONDY, M.L. et al. Brain tumor epidemiology: consensus from the Brain Tumor Epidemiology Consortium. **Cancer**. v. 113(7), p. 1953-68, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2016: Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2012: Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2011.

BRASIL. Portaria n. 599, de 26 de junho de 2012. Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do Tumor Cerebral no Adulto. **Ministério da Saúde**. Secretaria de Atenção à Saúde, 2012.

CHEN, C.C. et al. Berberine Protects against Neuronal Damage via Suppression of Glia-Mediated Inflammation in Traumatic Brain Injury. **PLoS One**. v. 9(12), p. 115694(30), 2014.

CHEN, T.C. et al. Involvement of reactive oxygen species and caspase-dependent pathway in berberine-induced cell cycle arrest and apoptosis in C6 rat glioma cells. **International Journal of Oncology**. v. 34(6), p. 1681-1690, 2009.

CHEN, Y. et al. Oxidative stress induces autophagic cell death independent of apoptosis in transformed and cancer cells. **Cell Death & Differentiation- Nature**. v. 15(1)p. 171-182, 2008.

CHEN, X. et al. ADAM17 promotes U87 glioblastoma stem cell migration and invasion. **Brain Research**. v. 1538, p. 151-158, 2013.

CHEN, X.W. et al. Interaction of herbal compounds with biological targets: A case study with berberine. **Scientific World Journal**. v. 2012, p. 708292(31), 2012.

CHENG, L. et al. Elevated invasive potential of glioblastoma stem cells. **Biochemical Biophysical Research Communications**. v. 406(4), p. 643-648, 2011.

CORRÊA, M. P. et al. [Markers expression of cell proliferation and apoptosis in basal cell carcinoma]. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 84(6), p. 606-614, 2009.

DALLE-DONNE, I. et al. Protein carbonylation, cellular dysfunction and disease progression. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**. v. 10 (2), p. 389-406. 2006.

FIRUZI, O. et al. Parameters of oxidative stress status in healthy subjects: their correlations and stability after sample collection. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 20, p. 139-148, 2006.

GRANT, R. Overview: brain tumour diagnosis and management/royal college of physicians guidelines. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**. v. 75 (2), p. 18–23, 2004.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in biology and medicine. 4th edition. **New York: Oxford University**, 2007.

HAN, Y. et al. Redox regulation of the AMP-activated protein kinase. **PLoS One**.v. 5(11), e. 15420, 2010.

HASSAN, M. et al. Apoptosis and Molecular Targeting Therapy in Cancer. **BioMed Research International**. v. 2014, p. 150845(23), 2014.

HUANG, W.J.; CHEN, W.W.;ZHANG, X. Proteasome inhibitors in glioblastoma. **Oncology letters**. v. 13(3), p. 1058–1062, 2017.

JACKSON, M. J. An overview of methods for assessment of free radical activity in biology. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 58, p. 1001-1006, 1999.

JIANG, S.X. et al. Berberine displays antitumor activity in esophageal cancer cells in vitro. **World Journal Gastroenterology**. v. 23(14), p. 2511-2518, 2017.

JIANG, Y.S. et al. Probucol suppresses human glioma cell proliferation *in vitro* via ROS production and LKB1-AMPK activation.**Acta Pharmacology**. v. 35(12), p. 1556–1565, 2014.

LI, W. et al. Berberine regulates AMP activated protein kinase signaling pathways and inhibits colon tumorigenesis in mice. **Molecular Carcinogenesis**. v. 54(10), p. 1096-1109, 2015.

LIOCHEV, S. I. Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 60, p. 1-4, 2013.

LIU, Q. et al. Molecular properties of CD133+ glioblastoma stem cells derived from treatment-refractory recurrent brain tumors. **Journal of Neuro-Oncology**. v. 94(1), p. 1-19, 2009.

LÓPEZ, A. et al. Antioxidantes, un paradigma en el tratamiento de enfermedades. **Revista Anacem**. v. 6 (1), 2012.

LOUIS, D.N. et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **Acta Neuropathologica**. v. 131(6), p. 803-820, 2016.

MARTINCORENA, I.; CAMPBELL, P.J. Somatic mutation in cancer and normal cells. **Science**. v. 349(6255), p. 1483-9, 2015.

MATTSON, M.P.; CHAN, S.L. Calcium orchestrates apoptosis. **Nature Cell Biology**. v. 5, p. 1041-1043, 2003.

McCARTY, M.F. AMPK activation--protean potential for boosting healthspan. **Age (Dordr)**. v. 36(2), p. 641-663, 2014.

MEERAN, S.M.; KATIYAR, S.; KATIYAR, S.K. Berberine-induced apoptosis in human prostate cancer cells is initiated by reactive oxygen species generation. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 229, p. 33-43, 2008.

MONTGOMERY, R.M.; QUEIROZ, L.S.; ROGERIO, F. EGFR, p53, IDH-1 and MDM2 immunohistochemical analysis in glioblastoma: therapeutic and prognostic correlation. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**. v. 73(7), p. 561-568, 2015.

NAKADA, M. et al. Molecular targets of glioma invasion Review. **Cellular and Molecular Life Science**. v. 64(4), p. 458- 478, 2007.

NONES, J. et al. Flavonoids and astrocytes crosstalking: implications for brain development and pathology. **Neurochemical Research**.v. 35(7), p. 955-966, 2010.

OLIVA, C.R. et al. Repositioning chlorpromazine for treating chemoresistant glioma through the inhibition of cytochrome c oxidase bearing the COX4-1 regulatory subunit. **Oncotarget**. v. 8(23), p. 37568-37583, 2017.

ORRENIUS, S.; ZHIVOTOVSKY, B.; NICOTERA, P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. v. 4(7), p. 552-565, 2003.

ORTIZ, L.M. et al. Multiple Effects of Berberine Derivatives on Colon Cancer Cells. **BioMed Research International**. v. 47(10), p. 824-833, 2014- a.

ORTIZ, L.M. et al. Berberine, an epiphany against cancer. **Molecules**. v. 19(8), p. 12349-12367, 2014-b.

PAN, Y. et al. Ccl5 establishes an autocrine high-grade glioma growth regulatory circuit critical for mesenchymal glioblastoma survival. **Oncotarget**. v. 8(20), p. 32977-32989, 2017.

PARK, S.H. et al. Berberine induces apoptosis via ROS generation in PANC-1 and MIA-PaCa2 pancreatic cell lines. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 48(2), p. 111–119, 2015.

PATNAIK, A.; MISHRA, S.S.; SENAPATI, S.B. Intraventricular glioblastoma multiforme mimicking meningioma and review of the literature. **Asian Journal of Neurosurgery**. v. 12(1), p. 75-77, 2017.

PAW, I. et al. Mechanisms regulating glioma invasion. **Cancer Letters**. v. 362(1). p. 1-7, 2015.

PISOSCHI, A.M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a Review. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 97, p. 55-74, 2015.

SALAZAR-RAMIRO, A. et al. Role of Redox Status in Development of Glioblastoma. **Frontiers in Immunology**. v. 7, p. 156, 2016.

SCHNEIDER, C.D.; OLIVEIRA, A.R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte - RBME**. v. 10(10), p. 308-13, 2004.

SIES, H.; BERNDT, C.; JONES, D.P. Oxidative Stress. **Annual Review of Biochemistry**. v. 86, p. 715-748, 2017.

STARK, A.M. et al. Glioblastoma multiforme—report of 267 cases treated at a single institution. **Surgical Neurology**. v. 63(2), p. 162-169, 2005.

STROJNIK, T. et al. Experimental Model and Immunohistochemical Comparison of U87 Human Glioblastoma Cell Xenografts on the Chicken Chorioallantoic Membrane and in Rat Brains. **Anticancer Research**. v. 30(12), p. 4851-4860, 2010.

STUPP R, et al. Chemoradiotherapy in malignant glioma: standard of care and future directions, **Journal of Clinical Oncology**. v. 25(26), p. 4127-4136, 2007.

TAN, X. et al. Tissue Distribution of Berberine and Its Metabolites after Oral Administration in Rats. **PLoS ONE**. v. 8(10), p. 77969(9), 2013.

TILLHON, M. et al. Berberine: New perspectives for old remedies. **Biochemical Pharmacology**. v. 84(10), p. 1260-7, 2012.

URSO, M.L.; CLARKSON, P.M. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. **Toxicology**. v. 189(1-2), p. 41-54, 2003.

YANG, X.; HUANG, N. Berberine induces selective apoptosis through the AMPK-mediated mitochondrial/caspase pathway in hepatocellular carcinoma. **Molecular Medicine Reports**. v. 8(2), p. 505-510, 2013.

YE, F. et al. Protective properties of radio-chemoresistant glioblastoma stem cell clones are associated with metabolic adaptation to reduced glucose dependence. **PLoS One**. v. 8(11), p. 80397, 2013.

YOUNG, R.M. et al. Current trends in the surgical management and treatment of adult glioblastoma. **Annals of Translational Medicine**. v. 3(9), p. 121, 2015.

YU, R. et al. Berberine-induced apoptotic and autophagic of HepG2 cells requires AMPK activation. **Cancer Cell International**. v. 14, p. 49, 2014.

YULYANA, Y. et al. Redox-Active Mn Porphyrin-based Potent SOD Mimic, MnTnBuOE-2-PyP (5+), Enhances Carbenoxolone-Mediated TRAIL- Induced Apoptosis in Glioblastoma Multiforme. **Stem Cell Reviews and Reports**. v. 12(1), p. 140-155, 2016.

VINCENT, H.K.; INNES, K.E.; VINCENT, K.R. Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. **Diabetes, Obesity and Metabolism**. v. 9(6), p. 813-839, 2007.

WEYDERT, C.J.; CULLEN, J.J. Measurement of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. **Nature Protocols**. v. 5(1), p. 51-66, 2010.

WU, D.; YOTNDA, P. Production and Detection of Reactive Oxygen Species (ROS) in Cancers. **Journal of Visualized Experiments**. v. 57, p. 3357(4), 2011.

XIANG, K., et al. The First Comprehensive Phylogeny of Coptis (Ranunculaceae) and Its Implications for Character Evolution and Classification. **PLoS ONE**. v. 11(4), p. 0153127(17), 2016.

XIE J. et al. Berberine-induced apoptosis in human breast cancer cells is mediated by reactive oxygen species generation and mitochondrial-related apoptotic pathway. **Tumor Biology**. v. 36(2), p. 1279-1288, 2015.

XIPELL, E. et al. Salinomycin induced ROS results in abortive autophagy and leads to regulated necrosis in glioblastoma. **Oncotarget**. v. 7(21), p. 30626–30641, 2016.

ZHANG, W. et al. Berberine Protects Mesenchymal Stem Cells against Hypoxia-Induced Apoptosis *in Vitro*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. v. 8, p. 1335-1342, 2009.

ZHOU, M. et al. Identifying Spatial Imaging Biomarkers of Glioblastoma Multiforme for Survival Group Prediction. **Journal of Magnetic Resonance Imaging**. v. 46 (1), p. 115-123, 2016.

ZHU, Y. et al. Berberine induces apoptosis and DNA damage in MG-63 human osteosarcoma cells. **Molecular Medicine Reports**. v. 10(4), p. 1734–1738, 2014.