

Universidade Federal de Santa Catarina
Centro Tecnológico
Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos
Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química
Grupo de Engenharia Genômica

**Efeito da aloína e do extrato do parênquima clorofiliano da
Aloe barbadensis na viabilidade de células tumorais
e na formação de vasos sanguíneos**

FERNANDA VIEIRA BERTI

Dissertação submetida ao
Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química da
Universidade Federal de Santa Catarina
como requisito parcial para
a obtenção do título de
Mestre em Engenharia Química.

Florianópolis, março de 2008

**Efeito da aloína e do extrato do parênquima clorofiliano da *Aloe barbadensis* na
viabilidade de células tumorais e na formação de vasos sanguíneos**

Por

Fernanda Vieira Berti

Dissertação julgada para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Química**, área de concentração **Processos Químicos e Biotecnológicos** e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Prof. Dr. Luismar Marques Porto
Orientador

Prof. Dr. Agenor Furigo Junior
Coordenador do CPGENQ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Paulo Fernando Dias
Co-orientador, presidente

Prof. Dr. Agenor Furigo Junior
Membro interno

Dr. Carlos Renato Rambo
Membro externo

Dr. Jarbas Mota Siqueira Junior
Membro externo

Florianópolis, março de 2008

Berti, Fernanda Vieira

Efeito da aloína e do extrato do parênquima clorofiliano da *Aloe barbadensis* na viabilidade de células tumorais e na formação de vasos sanguíneos.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

1 *Aloe barbadensis* — 2 aloína — 3 extrato do parênquima clorofiliano — 4 células de melanoma B16F10 — 5 vasculogênese — 6 angiogênese — 7 FGFb

Este trabalho é parte integrante das pesquisas realizadas pelo Grupo de Engenharia Genômica, e foi desenvolvido no Laboratório de Tecnologias Integradas do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos/CTC; no Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais/FMC; no Laboratório de Estudos em Bioatividade e Morfogênese Animal do Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética/CCB e no Laboratório de Bioquímica e Morfogênese Vegetal do Departamento de Fitotecnia/CCA da Universidade Federal de Santa Catarina.

*É preciso ter tempo para sonhar;
É preciso ter tempo para realizar sonhos;
É preciso ter tempo para estar com quem amamos;
Família um sonho para se viver eternamente...*

Dedico este trabalho ao meu pai,
Honório, que nesse momento sente
intensamente a importância deste estudo.
É para você com todo meu amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por iluminar meu caminho e me dar forças para continuar;

Ao professor Dr. Luismar Marques Porto pela orientação, oportunidade, apoio, dedicação, ensinamentos, incentivo, compreensão e valiosa amizade;

Ao professor Dr. Paulo Fernando Dias, pela co-orientação, por ter me apresentado à encantadora área biológica, pelo apoio incondicional, dedicação, colaboração e amizade;

À professora Dra. Rosa Maria Ribeiro do Valle e ao professor Dr. Marcelo Maraschin, que me receberam em seus laboratórios tornando este trabalho possível, muito obrigado pelo incentivo e relevante apoio;

Ao Sr. Vilson da empresa Macedo Koerich S.A. pelo fornecimento de material;

Aos meus colegas e amigos do Intelab: Derce, Gisele, Claudimir, Julia, Artiva, Elaine, Clayton, Sidnei, André e Felipe pelo aprendizado, companheirismo, amizade e a perseverança que juntos depositamos na pesquisa científica;

Ao Itamar e à Cíntia Soares pelos ensinamentos e valiosa contribuição na elaboração da modelagem matemática *in vitro*.

Aos colegas do Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal: Shirley, Priscila, Tales, Juércio, Dani, Luís, Pópo e a Mari, Silvia, do Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais e também à Vanessa, Wagner, Alcelmo e Johanna do Projeto Bioativos, muito obrigado pelo maravilhoso ambiente de trabalho, companheirismo e amizade;

Aos amigos Dr. Jarbas Mota Siqueira Junior e Luciano Henrique Campestrini, o apoio, o incentivo, convivência agradável, a paciência. Vocês foram mais do que colegas de laboratório, com vocês muito aprendi;

Aos meus pais, Honório e Maria Helena, e ao meu irmão Rodrigo pela maravilhosa família que somos! Muito obrigado pelas lições que tive desde os primeiros momentos de vida... Cheguei até aqui porque vocês estiveram ao meu lado durante todo o caminho... Devo tudo que sei e sou a vocês. Vocês iluminam meu viver;

A você Léo, o amor que me faz forte, a alegria de estar ao teu lado, a paz do meu coração, a simplicidade de ver a vida, a energia que me encanta. Obrigado por iluminar meus momentos e estar sempre ao meu lado; seu apoio foi e é fundamental. Hoje tenho a certeza de estar no caminho certo porque te encontrei;

Aos meus sogros Cida e Menegotto e aos meus cunhados Aline e Denis as palavras de conforto, o incentivo, o apoio incondicional, e por entenderem as minhas ausências. Obrigado pelo carinho, amo muito vocês;

A você Ni minha amiga do coração, a nossa iluminada amizade, aos momentos bons e difíceis em que você esteve ao meu lado, aos dias e noites de estudo, a nossa big fr... Ni e Neto amo vocês;

Ao Binho um ser maravilhoso que com apenas um olhar me encoraja e que sem palavras fico para dizer o quanto significa pra mim;

À Rezinha, amiga que me acompanhou durante a realização dos experimentos *in vitro* e que se tornou uma pessoa muito especial; muito obrigado e muita saudade;

Ao Dr. Carlos Renato Rambo, à nossa grande amizade, ao apoio incondicional, aos momentos de diversão e aprendizado, às palavras de conforto... Carlos e Dali, adoro muito vocês;

À Dani, Magda, Ana Laura, Mari, Lucas, Karol, Laura e Cíntia pelos bons momentos de convivência diária e pela valiosa amizade. Em especial a você Karol que sempre esteve ao meu lado nos momentos bons e difíceis dessa vida.

Aos amigos Rosi e Paulo pela maravilhosa amizade, companheirismo e pelos momentos de adrenalina que a aventura nos proporciona.

À minha grande amiga Ana Paula, fico sem palavras para agradecer aos momentos vividos desde a infância... mesmo distante você esteve ao meu lado em todos os momentos.

Aos amigos Carlos Eduardo e Ingrid todos os momentos de descontração, companheirismo e grande amizade.

Aos meus amigos e colegas, pelo incentivo, insistência, carinho, paciência, companheirismo e compreensão;

A todos que, de uma maneira ou outra, contribuíram para que fosse possível a realização deste trabalho.

Agradeço, *in memoriam*, ao Dr. Judah Folkman, por tornar mais encantador o meu trabalho.

À Mãe Iemanjá, à energia do mar, que esteve à minha volta todos os dias e noites.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	vii
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
Capítulo 1 Introdução	1
Capítulo 2 Fundamentação Teórica	3
2.1 Aloe vera	3
2.2 Aspectos relativos à patogenia de melanoma	6
2.3 Modelos experimentais <i>in vitro</i>	7
2.4 Vacularização relacionada ao desenvolvimento de tumores.....	8
2.5 Processos de formação de vasos sanguíneos.....	9
Capítulo 3 Objetivos	14
3.1 Objetivos Gerais	14
3.2 Objetivos específicos	14
Capítulo 4 Materiais e Métodos	15
4.1 Obtenção do Extrato do Parênquima Clorofiliano (EPC).....	15
4.2 Aloína padrão.....	15
4.3 Avaliação da bioatividade <i>in vitro</i>	15
4.3.1 Cultura de Células.....	15
4.3.2 Ensaio de viabilidade celular	16
4.3.3 Modelagem Matemática Computacional.....	17
4.4 Avaliação da bioatividade <i>in vivo</i>	18
4.4.1 Ovos de galinha embrionados da espécie <i>Gallus domesticus</i>	18
4.4.2 Ensaio de vasculogênese na vesícula vitelínica do embrião de galinha..	19
4.4.3 Ensaio de angiogênese na membrana corioalantóica do embrião de galinha.....	21
Capítulo 5 Resultados e Discussão	23
Capítulo 6 Conclusões e Sugestões	41
Referências Bibliográficas.....	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A folha da <i>Aloe vera</i> é dividida em extrato do parênquima de reserva (EPR) ou gel e extrato do parênquima clorofiliano (EPC) ou látex.	4
Figura 2. Estrutura química da aloína	5
Figura 3. Metodologia aplicada na avaliação da bioatividade da aloína e do extrato do parênquima clorofiliano (EPC) de <i>A. barbadensis in vitro</i>	16
Figura 4. Metodologia experimental aplicada na avaliação da bioatividade da aloína e do extrato do parênquima clorofiliano (EPC) de <i>A. barbadensis in vivo</i>	18
Figura 5. Medidas céfálico cervical (CCV) e cervical caudal (CVC) realizados nos embriões da espécie <i>G. domesticus</i> . (Dias et al., 2005).....	20
Figura 6. Viabilidade celular em função da concentração de aloína-padrão (0,01–230 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (a) e extrato do parênquima clorofiliano (EPC) (0,01–100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (b) . Os resultados foram expressos em percentagem do grupo controle (meio de cultura DMEM). * Diferenças significativas ao nível de $P < 0,05$ em relação ao grupo controle (ANOVA seguida do teste de Tukey).	23
Figura 7. Curva representativa de morte celular em função da concentração de aloína, após 48 h de exposição ao efetor. Os dados experimentais representam médias de oito experimentos (poços) para cada condição de concentração.....	27
Figura 8. Curva representativa de morte celular em função da concentração do extrato do parênquima clorofiliano (EPC), após 48 h de exposição. Os dados experimentais representam médias de oito experimentos (poços) para cada condição de concentração.....	28
Figura 9. Percentagem do número de vasos em função da concentração da aloína (a) e do extrato do parênquima clorofiliano (EPC) (b) na vasculogênese de embriões de <i>Gallus domesticus</i> com quatro dias de desenvolvimento. * Diferenças significativas ao nível de $P < 0,05$, em relação ao grupo controle (ANOVA seguido do teste Tukey).....	31
Figura 10. Percentagem de comprimento céfálico (segmento corpóreo CCV) em função da concentração da aloína (a) e do extrato do parênquima clorofiliano (EPC) (b) na morfogênese de embriões de <i>Gallus domesticus</i> com quatro dias de desenvolvimento.....	33
Figura 11. Percentagem do comprimento total (cefálico- cervical- caudal) em função da concentração de aloína (a) e do extrato do parênquima clorofiliano (EPC) (b) na biometria de embriões de <i>Gallus domesticus</i> com quatro dias de desenvolvimento.....	34
Figura 12. Percentagem do número de vasos em função da concentração da aloína (a) e do extrato do parênquima clorofiliano (EPC) (b) na angiogênese de embriões de <i>Gallus domesticus</i> com oito dias de desenvolvimento. * Diferenças significativas ao nível de $P < 0,05$, em relação ao grupo controle (ANOVA seguido do teste de Tukey).....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros de toxicidade celular, obtidos por regressão não-linear do modelo proposto, Equação (9), considerando-se constantes os valores experimentais iniciais de densidade óptica até a concentração de $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 29

Tabela 2. Valor crítico de concentração do efetor para morte celular determinado a partir do modelo matemático proposto. 29

LISTA DE ABREVIATURAS

EPC: Extrato do parênquima clorofiliano

MV: Membrana vitelínica

MC: Membrana corioalantóica

FGFb: Basic fibroblast growth Factor (Fator de crescimento fibroblastico básico)

INCA: Instituto Nacional do Câncer

MTT: brometo de 3-[4,5-dimetil-tiasol-2-il]-2,5-difeniltetrazol

DMEM: meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium

MMPs: Metaloproteinases de matriz

VEGF: Vascular endothelial growth factor (Fator de crescimento endotelio vascular)

B16F10: Linhagem celular obtida de metástases pulmonares de melanoma

TIMPs: Inibidores teciduais de metaloproteinases

CAM-assay: Ensaio da membrana corioalantóica

DMSO: Dimetil sulfóxido

CCV: comprimento flexuras cefálica-cervical

CCC: comprimento flexuras cervical-caudal

CVC: comprimento flexuras cervical-cefálica

NIH: National Institute of Health

ECM: Matriz extracelular

RESUMO

Aloe barbadensis, uma espécie originária do continente africano adaptada no Brasil, possui diversas propriedades medicinais determinadas por metabólitos encontrados nos extratos dos parênquimas de reserva e clorofiliano. Este último é rico em antraquinonas, sendo constituído majoritariamente de aloína. No presente trabalho, foram estudados os efeitos do extrato do parênquima clorofilano (EPC) e da aloína sobre a viabilidade de células tumorais da linhagem B16F10 *in vitro* e a formação de vasos sanguíneos de embriões de *Gallus domesticus in vivo*. Na análise *in vitro*, células incubadas a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂, foram tratadas em diferentes concentrações de aloína e de EPC. Tanto a aloína (0,01 a 230 µg·mL⁻¹) como o EPC (0,01 a 100 µg·mL⁻¹) reduziram a viabilidade das células tumorais. Os dados experimentais foram representados através de um modelo matemático, evidenciando que o EPC mostrou-se 2,3 vezes mais citotóxico para as células tumorais do que a aloína. Ao contrário do verificado sobre a atividade antitumoral, a aloína (10 a 320 µg·mL⁻¹) e o EPC (10 a 320 µg·mL⁻¹) estimularam de modo dose-dependente a vasculo/angiogênese na membrana vitelínica (MV) em 154 e 177% e a angiogênese na membrana corioalantóica (MC) em até 131 e 164%, respectivamente. Verificou-se ainda que o efeito da aloína e do EPC superaram o efeito do fator angiogênico FGFb na formação de vasos primordiais na MV (135%), sendo que para a angiogênese, na MC, apenas o EPC foi mais efetivo que o FGFb (164% versus 158%). Os tratamentos não modificaram o padrão de crescimento e a morfogênese dos embriões, com base nas medidas de comprimento total e percentual de comprimento cefálico de embriões com quatro dias de desenvolvimento. Os resultados demonstram que a aloína e o EPC exerceram efeito citotóxico especificamente nas células tumorais, mas promoveram atividade pró-vasculogênica e pró-angiogênica, superior a do fator angiogênico FGFb, sem qualquer evidência de embriotoxicidade. Com base nos resultados é possível concluir que o EPC e a substância isolada, sob estudo, mostraram concomitantemente um potencial efeito antitumoral e uma atividade estimulante em processos fisiológicos como a vascularização de tecidos normais.

Palavras-chave: *Aloe barbadensis*, aloína, extrato do parênquima clorofiliano (EPC), células de melanoma B16F10, vasculogênese e angiogênese, FGFb.

ABSTRACT

Aloe barbadensis, an originary plant species of African continent well adapted in Brazil, possesses many medicinal properties due to presence of the metabolites found in the extracts of the reserve and chlorophyll parenchymas. This last extract is rich in anthraquinones, such as aloin. In the current work, it were studied the effects of the chlorophyll parenchyma extract (CPE) and aloin on viability of melanoma cells of the B16F10 lineage *in vitro* as well as in the formation of blood vessels of chick embryos *in vivo*. In the *in vitro* analysis, cells were incubated at 37.5 °C in atmosphere with 5% de CO₂ and treated with different concentrations of aloin and CPE. Aloin (0.01 to 230 µg·mL⁻¹) and CPE (0.01 to 100 µg·mL⁻¹) decreased the tumor cell viability as compared to control (vehicle). These experimental data were depicted by means of a mathematical model, evidencing that CPE is a 2.3 times more citotoxic to tumoral cells than aloin. Differently from the recorded to tumor cells, aloin (10 to 320 µg·mL⁻¹) and CPE (10 to 320 µg·mL⁻¹) promoted in a dose-dependent way the vasculo/angiogenesis in the vitelline membrane (VM) of the yolk sack by 154 and 177% and the angiogenesis in the chorioallantoic membrane (CAM) by 131 and 164% respectively. Besides, the effects of treatment with aloin and CPE were more pronounced than the effect of the well known angiogenic factor bFGF (positive control), in the primordial vessels in VM (135%), and in the angiogenesis, only CPE was more effective than the bFGF (164% versus 158%). The treatments did not modified the embrionic pattern of growth and morphogenesis, related to total body length as well percentage cephalic length of 4-day embryos. The findings demonstrate that aloin and CPE exert a citotoxic effect in tumor cells whereas have promoted pro-vasculo/angiogenic activities, in a higher level as compared to bFGF, without any evidence of embriotoxicity. Taken in whole, those findings show that CPE and the isolated substance - aloin yield concomitantly a potential antitumoral effec and a stimulant activity in physiological processes, such as the embryonic vessel formation under study.

Keywords: *Aloe barbadensis*, aloin, chlorophyll parenchyma extract, murine melanoma cell line B16F10, vasculogenesis and angiogenesis, bFGF.

Capítulo 1

Introdução

Plantas medicinais têm sido tradicionalmente utilizadas por populações de todos os continentes no controle de diversas doenças. Evidências históricas indicam a origem africana da *Aloe vera*, havendo registros de espécies cultivadas no Egito há milhares de anos, assim como sua utilização como medicamento, pelos povos do Mediterrâneo que remontam ao ano de 400 a.C. (Araújo *et al.*, 2000). Existe um crescente interesse comercial relacionado ao uso da *A. vera*, tanto no setor cosmético como farmacêutico, isso se deve ao alto grau de confiança que diversos segmentos da população depositam em seus efeitos terapêuticos (Chow *et al.*, 2005).

Existem no mínimo 250 espécies de *A. vera* conhecidas (família *Liliaceae*) (Kawai *et al.*, 1993), mas somente três ou quatro dessas apresentam propriedades medicinais, sendo a *Aloe barbadensis* a de maior interesse terapêutico e nutricional (Araújo *et al.*, 2000). Estudos têm demonstrado a utilização da *A. barbadensis*, popularmente denominada babosa, como fonte de compostos com atividades farmacológicas, tais como as antraquinonas presentes no extrato do parênquima clorofiliano (EPC), onde a aloína se encontra como constituinte majoritário (Chow *et al.*, 2005).

Um dos aspectos que suscita maior interesse é a possibilidade de que os compostos presentes no extrato do parênquima clorofiliano (EPC) possam atuar como agentes antitumorais. Além disso, diversos tipos de tumores, geralmente, não crescem mais do que uns poucos milímetros, a menos que o desenvolvimento de um suprimento de vasos sanguíneos seja induzido, de modo a invadir e subsidiar o desenvolvimento da massa tumoral (Kandel *et al.*, 1991; Carmeliet e Jain, 2000; Bergers e Benjamin, 2003). Para disseminar no organismo, colonizando diferentes órgãos (metastização), as células tumorais inicialmente acessam o sistema linfático, ou arterial, podendo então extravasar e invadir o tecido conjuntivo. A formação de vasos sanguíneos pode ocorrer por diferentes processos

que incluem a vasculogênese e a angiogênese. O primeiro, consiste na formação de vasos sanguíneos a partir de células progenitoras endoteliais que proliferam, migram e diferenciam-se, estruturando os vasos sanguíneos primordiais. A angiogênese, por outro lado, é um processo subsequente, que ocorre a partir dos vasos pré-existentes formados na vasculogênese, os quais proliferam para viabilizar o crescimento do corpo e a ramificação de novos capilares (Risau *et al.*, 1988; Folkman, 1995). Quando alterados, os processos de formação de vasos sanguíneos tornam-se críticos para o crescimento de tumores sólidos e a formação de metástases (Folkman e Klagsbrun, 1987).

No contexto da investigação pré-clínica, ensaios *in vitro* e *in vivo* vêm sendo utilizados com o objetivo de avaliar os respectivos efeitos de substâncias bioativas, extraídas de espécies vegetais, tanto sobre patogenias, como os tumores, como em células ou tecidos saudáveis, em processos fisiológicos, a exemplo da vascularização embrionária.

Capítulo 2

Fundamentação Teórica

2.1 Aloe vera

A *Aloe vera* se distingue de outras plantas por manter sua popularidade como planta medicinal durante um longo período de tempo (Grindlay e Reynolds, 1986). A *Aloe vera* têm sido utilizada terapeuticamente desde o período de dominação romana (Reynolds e Dweck, 1999; Turner *et al.*, 2004). Existem no mínimo 250 espécies de *Aloe* conhecidas (Kawai *et al.*, 1993), mas somente três ou quatro dessas apresentam propriedades medicinais, sendo a *Aloe barbadensis* a de maior interesse terapêutico e nutricional (Araújo *et al.*, 2000).

Aloe barbadensis é uma planta pertencente à família das Liliaceas, popularmente conhecida como babosa (Grindlay e Reynolds, 1986). As folhas da *A. barbadensis* são esverdeadas, côncavas na parte superior e convexas na inferior; possui espinhos triangulares curtos e espaçados, e as folhas são carnosas e manchadas (Grindlay e Reynolds, 1986).

A planta é separada em dois produtos básicos: gel e látex, como mostrado na **Figura 1**, (Lulinski e Serwatowski, 2003). O gel da babosa é a polpa da folha ou mucilagem, uma substância clara e pouco consistente, semelhante a uma geléia, obtida do tecido parênquimal que compõe a porção interna da folha (Tyler, 1993). O extrato do parênquima clorofiliano (EPC) da *Aloe barbadensis* é um líquido de consistência leitosa, coloração amarelo-ocre, sabor amargo e aroma rançoso, sendo produzido por células excretoras do mesófilo, localizado logo abaixo da epiderme das folhas (Leung, 1977).

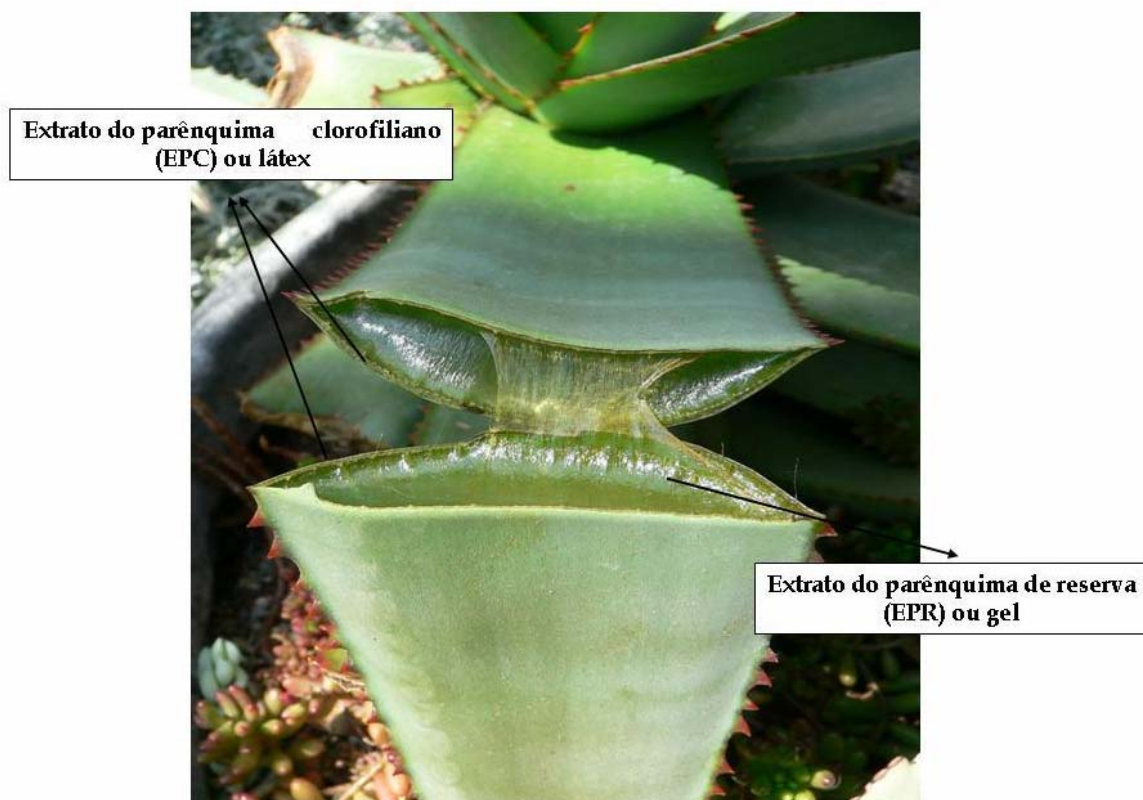
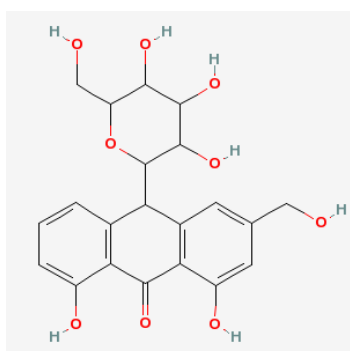


Figura 1. A folha da *Aloe vera* é dividida em extrato do parênquima de reserva (EPR) ou gel e extrato do parênquima clorofiliano (EPC) ou látex.

O extrato do parênquima clorofiliano (EPC) extraído das folhas possui cerca de 80 constituintes, muitos deles ainda não identificados. Os principais metabólicos secundários descritos e identificados da *Aloe barbadensis* são os compostos fenólicos do tipo antronas, cromonas e fenil-pirronas (Carrasco *et al.*, 2000). Dentre os derivados, as antraquinonas são as mais estáveis sendo que a maioria das antronas é relativamente oxidada a antraquinonas (Falkenberg *et al.*, 2004). O extrato do parênquima clorofilano (EPC) é rico em glicosídeos das antraquinonas aloína A e B, que compõem cerca de 10 a 30% dos componentes. A aloína, uma molécula de estrutura planar, solúvel em água, é o principal componente fisiologicamente ativo isolado inicialmente da *Aloe barbadensis* (Grindlay e Reynolds, 1986; Odes e Madar, 1991). A aloína é sensível à luz, ao pH e à temperatura, podendo ser oxidada à aloe emodina. A espécie *Aloe barbadensis* contém de 16 a 63% de material resinoso e óleo volátil (Leung, 1977).

Quimicamente, a estrutura da aloína, mostrada na **Figura 2**, foi definida como sendo constituída de C-glicosídeos de antraquinonas. A aloína é uma antrona C-glicosilada, que é uma mistura de dois diastereisômeros: aloína A (configuração C₁₀, C₁: S,S) e aloína B (configuração C₁₀, C₁: R, S) (Haynes, 1960). A aloína possui propriedades laxantes, purgativas e antiinflamatórias (Leung, 1977).



Nome popular: Aloína ou barbaloína

Fórmula estrutural: C₂₁H₂₂O₉

Nomenclatura IUPAC:

1,8-di-hidroxi-3-(hidroximetil)-10-[3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil) oxan-2-il]-10H-antracên-9-ona.

Massa molar = 418,394 g/mol

Figura 2. Estrutura química da aloína

(Fonte: Projeto PubChem, <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>).

Os demais componentes do extrato do parênquima clorofiliano (EPC) são a aloesina, aloeresina, barbaloína, aloe-emodina, homonataloína, nataloe-emodina e aloinosídeo (Zonta *et al.*, 1995; Koch, 1996; Alves *et al.*, 2004). Okamura e colaboradores (1996) isolaram do extrato do parênquima clorofiliano de *Aloe barbadensis* novas cromonas: 8-C-glucosil-7-O-metil-(S)-aloesol, isoaloerisina D e aloeresina. No mesmo ano, Koch (1996), isolou das raízes da planta uma nova antrona denominada aloe barbendol, ao mesmo tempo em que outros três compostos derivados do extrato do parênquima clorofiliano foram encontrados: emodina, aloe crisona e barbaloína. Além dos componentes anteriormente mencionados, compostos de baixo peso molecular, tais como dietilhexilftalato, vitaminas A, C, D, do complexo B, saponinas, ácido salicílico, esteróides e enzimas também estão presentes na planta (Moon *et al.*, 1999; Araújo *et al.*, 2000; Choi e Chung, 2003).

Farmacologicamente, a aloína é um componente com efeito catártico (laxante), encontrado no extrato da *Aloe barbadensis* (Mapp e McCarthy, 1970) e outras espécies. Os chineses têm utilizado há milênios a *Aloe barbadensis* no

tratamento da constipação intestinal (Chung, Cheong, Lee *et al.*, 1996; Tian e Hua, 2005) e como tônico fortificante do estômago (Chung, Cheong, Park *et al.*, 1996).

Ao longo da última década tem sido descrita a atividade farmacológica de uma diversidade de princípios ativos, provenientes de fontes naturais (Calixto e Cabrini, 1997). As antraquinonas têm sido freqüentemente utilizadas na medicina como agente antipsoríase (Sydiskis *et al.*, 1991). Derivados antraquinônicos também mostraram inibição de várias viroses *in vitro*, incluindo herpes simples do tipo 1 e 2, varicela-zoster e influenza (Sydiskis *et al.*, 1991). Além disso, segundo este último autor, atualmente muitos compostos originários da *Aloe barbadensis* vêm sendo testados na cura de doenças como asma, isquemia, hipertensão, psoríase, artrite reumatóide e vários tipos de câncer. Seu modo de ação não é exatamente conhecido, ainda que muitas moléculas e tipos celulares tenham sido identificados como potenciais alvos dessas antraquinonas.

Algumas propriedades terapêuticas importantes, comuns aos extratos e compostos isolados da *Aloe barbadensis*, particularmente as atividades antiinflamatória e antitumoral sugerem, por hipótese, que alguns desses princípios ativos sejam também moduladores eficazes da formação de vasos sanguíneos.

2.2 Aspectos relativos à patogenia de melanoma

Câncer (do grego *karkinos* - caranguejo) é um termo que descreve um conjunto de mais de uma centena de doenças, que apresentam em comum a proliferação desordenada e a incapacidade de diferenciação celular normal. A progressão tumoral é o processo pelo qual as células adquirem características de malignidade, como crescimento progressivo, invasão e formação de metástases (Nowell, 1986).

O melanoma é um tumor maligno com grande propensão à formação de metástases, sendo bastante resistente às terapias antitumorais atualmente utilizadas. Esse tipo de câncer é predominante em adultos jovens e está relacionado à exposição às radiações, com aumento de sua freqüência em função dos raios solares (Ferrier *et al.*, 1998). Embora só represente 4% dos cânceres de

pele, o melanoma é considerado o mais virulento em razão da acentuada invasibilidade e capacidade metastática.

No Brasil, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), em 2002 foram registrados 3.050 casos de melanoma, dos quais 1.085 evoluíram para o óbito. Como resultado da transformação de melanócitos e do desenvolvimento do processo tumoral, as células de melanoma da epiderme atravessam a membrana basal, invadem a derme e formam pequenos agregados celulares. Quando esses micronódulos de células tumorais crescem em espessura, o melanoma pode invadir vasos linfáticos e sangüíneos, originando metástases em diversas regiões, sendo primariamente localizadas em linfonodos e em seguida, mais freqüentemente, nos pulmões e no cérebro (Ferrier *et al.*, 1998).

Tumores crescem e desenvolvem metástases por meio da formação de vasos sangüíneos (neoangiogênese). Um banco de dados desenvolvido nas últimas três décadas documenta que as investigações sobre os mecanismos envolvidos na angiogênese patológica converteram-se em uma abordagem potencialmente importante na terapia do câncer (Fidler, 1973; Hanahan e Folkman, 1996; Calixto e Cabrini, 1997). A busca por diretrizes voltadas ao aprimoramento de terapias não convencionais passa pelo entendimento das diferenças em relação aos mecanismos de angiogênese fisiológica e tumoral (Reddy *et al.*, 2003). No entanto, as drogas ao atingirem a massa tumoral podem atuar diretamente sobre as células tumorais ou ainda, poderiam atuar indiretamente modulando, por exemplo, a vascularização, uma estrutura essencial para a sobrevivência da massa tumoral.

2.3 Modelos experimentais *in vitro*

Produtos naturais têm iniciado uma etapa altamente significativa na descoberta de novos fármacos para a cura do câncer, sendo que modelos de cultura celular tornam-se essenciais na investigação da citotoxicidade desses produtos (Kametani *et al.*, 2007). As células de melanoma da linhagem B16F10 são citadas como referência para testes de citotoxicidade de produtos com suposta atividade no tratamento do câncer (Sa-Rocha *et al.*, 2006). B16F10 é uma linhagem

obtida de metástases pulmonares de melanoma isolada de camundongos da linhagem black C57BL/6 (Sa-Rocha *et al.*, 2006).

A viabilidade celular está relacionada à função mitocondrial da célula, podendo ser avaliada por diferentes métodos descritos na literatura (Mosmann, 1983; Carmichael *et al.*, 1987). Uma das alternativas é uma técnica fotolorimétrica utilizando-se o MTT. O MTT é um sal de tetrazólio que reduzido a um derivado formazan de cor azulada, devido à atividade oxidativa, indica a existência de função mitocondrial e, por conseguinte, a viabilidade da célula (Mosmann, 1983; Carmichael *et al.*, 1987).

As atividades biológicas estudadas em sistemas-modelo podem ser acompanhadas de processos de modelagem matemático-computacional. Esses modelos aprimoram a compreensão sobre os mecanismos farmacológicos envolvidos.

2.4 Vascularização relacionada ao desenvolvimento de tumores

Para disseminar e colonizar novos órgãos, as células tumorais acessam o sistema linfático, ou arterial, podendo então extravasar e invadir o tecido conjuntivo. Estes eventos envolvem os mecanismos de adesão, espraiamento e migração celular (Aplin *et al.*, 1998). O papel da angiogênese na biologia do câncer foi descrito inicialmente por Folkman (1971), que postulou e descreveu o fenômeno da dormência do tumor, na ausência de vascularização. Quando descontrolado, o processo de angiogênese torna-se crítico para o crescimento de tumores sólidos e formação de metástases. Um tumor, geralmente, não pode crescer mais do que uns poucos milímetros, a menos que o desenvolvimento de um novo suprimento de vasos sanguíneos seja induzido, de modo a invadir e vascularizar a massa tumoral (Kandel *et al.*, 1991; Carmeliet e Jain, 2000; Bergers e Benjamin, 2003). A angiogênese fisiopatológica (neovascularização) também é característica em diversas doenças desprovidas de malignidade, mas que

implicam em algum nível de incapacitação do paciente, incluindo a artrite reumatóide, a endometriose, a psoríase e retinopatias proliferativas (Folkman e Klagsbrun, 1987; Folkman, 1995; Jones *et al.*, 2001).

Além disso, a virtual possibilidade apresentada por alguns tumores malignos de crescerem e formarem metástases resulta de sua capacidade de produzirem substâncias que induzam a neoangiogênese. Este evento, constitui uma etapa adicional às modificações genéticas e epigenéticas que ocorrem durante a transformação de uma célula normal em tumoral (Nguyen *et al.*, 1994; Hanahan e Folkman, 1996; Koch, 1998; Carmeliet e Jain, 2000). Portanto, propriedades biológicas de vasos que são relevantes na embriogênese também o são para o crescimento de tumores (Folkman, 1995; Hendrix *et al.*, 2003). Embora uma pequena percentagem de células indiferenciadas – células precursoras endoteliais – possa ser incorporada aos vasos do tumor a maior parte da neovascularização de tumores parece ocorrer via angiogênese (Hendrix *et al.*, 2003).

Na angiogênese fisiológica, novos vasos sofrem maturação rápida e se tornam estáveis, enquanto nos tumores – descritos como ferimentos que jamais cicatrizam (Dvorak, 1986) – o crescimento de vasos sanguíneos é mantido constante, sem alcançarem a estabilidade. Geralmente células tumorais apresentam fluxo sanguíneo lento e oscilante, apresentando extravasamento de proteínas plasmáticas. Inúmeras linhagens de células tumorais expressam diversos fatores angiogênicos, a exemplo do FGFb, o qual pode vir a ser super expresso e secretado de forma seletiva (Gagliardi e Collins, 1993; Bergers *et al.*, 1998; Mundhenke *et al.*, 2002). Processos de vasculogênese e angiogênese são importantes na estruturação de tecidos vascularizados e podem ser induzidos ou bloqueados por substâncias bioativas extraídas de espécies vegetais.

2.5 Processos de formação de vasos sanguíneos

O sistema cardiovascular é um dos primeiros sistemas a iniciar o desenvolvimento, estabelecendo-se durante o período embrionário a partir da camada germinativa intermediária do embrião – o mesoderma – através de processos que envolvem interações entre diferentes linhagens celulares (Gilbert *et*

al., 2000; Jones *et al.*, 2001). Esse sistema compõe-se do coração, vasos sanguíneos (artérias, veias e capilares) e vasos linfáticos. Vasos sanguíneos são estruturas constituídas basicamente de uma monocamada de células endoteliais, as quais se interconectam para formar tubos que viabilizam o fluxo do sangue e a perfusão tecidual no organismo (Tobelem, 1990; Sweeney *et al.*, 1998). A formação de vasos sanguíneos pode ocorrer a partir de diferentes processos, como a vasculogênese e a angiogênese, nos quais estão envolvidos mecanismos celulares, como a proliferação, a migração e a diferenciação (Risau, 1997; Bouis *et al.*, 2006).

A vasculogênese é um processo definido como o desenvolvimento de vasos sanguíneos a partir da proliferação *in situ* de células mesodérmicas progenitoras de células endoteliais (angioblastos e hemangioblastos) (Risau *et al.*, 1988). Estas células precursoras são recrutadas de áreas de mesoderma adjacentes ao embrião e/ou originadas por divisão celular local, organizando ilhotas sanguíneas e estabelecendo um plexo vascular primordial (Ruitter *et al.*, 1992).

Subseqüentemente, através da angiogênese, a rede de vasos primários sofre uma remodelagem, combinando eventos de morte e regressão vascular com a sobrevivência e ramificação de capilares a partir de vasos pré-existentes, os quais proliferam para viabilizar o crescimento do corpo (Folkman, 1971). No embrião, os dois processos de formação de vasos coexistem; por exemplo, o desenvolvimento do coração e dos grandes vasos ocorre por vasculogênese, enquanto órgãos que requerem invasão de vasos sanguíneos para o desenvolvimento (cérebro, pulmões e fígado) são supridos por angiogênese (Risau *et al.*, 1988). A formação de vasos sanguíneos é mantida sob rígido controle no organismo do adulto, assim, a angiogênese é usualmente desprezível após ter sido alcançada essa fase da vida (Folkman, 1971; Folkman e Shing, 1992). Porém, esse processo ainda continua desempenhando no adulto um papel fundamental em inúmeros processos fisiológicos, por exemplo, no ciclo reprodutivo feminino e na cicatrização (Folkman e Klagsbrun, 1987; Bergers e Benjamin, 2003).

Por outro lado, erros na regulação da angiogênese levam ao crescimento descontrolado de vasos, o que é crítico em diversas patologias, como a artrite reumatóide e alguns tipos de câncer (Folkman e Klagsbrun, 1987; Koch, 1998). A

manutenção do sistema vascular é baseada na coexistência de sinais angiogênicos (ativadores) e angiostáticos (inibidores) em um equilíbrio dinâmico de concentrações estritamente controladas (D'amore e Thompson, 1987), mas que pode ser rapidamente estimulado ou inibido (Hanahan e Folkman, 1996). Devido à complexidade na regulação de suas funções, a célula endotelial poderia ser comparada a uma “megalópole” de mediadores e receptores de sinais anti e pró-angiogênicos (Jones *et al.*, 2001).

O processo de angiogênese é regulado por fatores ativadores angiogênicos, como o FGFb (*fibroblast growth factor-basic*) e VEGFs (*vascular endothelial growth factor*) (Fachinger *et al.*, 1999; Yancopoulos *et al.*, 2000a). Apesar de ser uma molécula inespecífica em relação ao endotélio, o FGFb (18 kDa) é capaz de induzir a angiogênese *in vivo*.

Esses fatores exercem atividade sobre as células endoteliais, levando, por exemplo, à ativação de enzimas denominadas metaloproteinases de matriz (MMPs) e de ativadores plasminógenos, sendo fundamentais no mecanismo de migração celular, no processo de tubulogênese (Soeda *et al.*, 1992; Soeda *et al.*, 1997; Fachinger *et al.*, 1999; Yancopoulos *et al.*, 2000b).

Cornelius e colaboradores (1995) demonstraram, com base em vários estudos, que a indução das metaloproteinases de matriz (MMPs) está vinculada ao bloqueio de seus inibidores teciduais - TIMPs (*tissue inhibitors of metaloproteinases*) e que a redução na sua expressão desencadeia a atividade proteolítica na matriz extracelular. Isto permite que nos estágios iniciais da angiogênese, as células endoteliais migrem de forma eficiente através do tecido conjuntivo, enquanto que no estágio final, em que há a formação de vasos funcionais, ocorrem deposição e estabilização da matriz extracelular endotelial, acompanhada de uma redução na expressão das metaloproteinases de matriz, concomitante com a indução dos respectivos TIMPs.

Evidências mostram que a angiogênese depende fundamentalmente de eventos de adesão entre as células endoteliais (Ingber *et al.*, 1990), e envolve a participação de moléculas como caderinas, integrinas e selectinas (Wagener e Ergun, 2000). As caderinas vasculares endoteliais são mediadas por interações

dependentes de cálcio e estão conectadas a um conjunto de proteínas ligadas ao citoesqueleto (Horwitz, 1997). Desequilíbrios nos canais de Ca^{2+} demandam alterações metabólicas nas células e podem resultar em indução da angiogênese em diferentes tecidos (Agocha *et al.*, 1997).

Assim, a estabilidade dos vasos sanguíneos está normalmente condicionada à presença de fatores angiogênicos e é complementada com a organização de uma lâmina basal e com o restabelecimento dos contatos entre as células endoteliais e a matriz extracelular recém reconstituída (Lockshin e Zakeri, 2001).

2.5 Modelos experimentais *in vivo*

As estratégias clássicas *in vivo* incluem injeções nas membranas de ovos de galinha doméstica (*Gallus domesticus*), entre as quais a câmara de ar da casca ou na membrana vitelínica (Oppenheim *et al.*, 1973; Sneddon *et al.*, 1998) e o ensaio da membrana corioalantóica (CAM-assay) do embrião desta espécie.

No ensaio da membrana corioalantóica, as substâncias em estudo são geralmente adsorvidas em suportes de colágeno, metilcelulose, poliestireno, etc (Oppenheim *et al.*, 1973; Gagliardi *et al.*, 1993; Dordunoo *et al.*, 1995; Iruela-Arispe *et al.*, 1995; Shibley e Pennington, 1998). No âmbito dos estudos de vascularização através dos ensaios da membrana vitelínica (MV) e da membrana corioalantóica (MC), a utilização de ovos de galinha fertilizados traz algumas vantagens aos laboratórios. A rotina de incubação em estufas é simples, econômica e oferece a possibilidade de manipulação de um número racional de unidades amostrais (Schoenwolf, 1994).

A fisiologia, a genética e a embriologia da galinha, espécie *Gallus domesticus*, está extensamente documentada. Cada embrião desenvolve-se em um ambiente próprio, livre de influência materna ou placentária, e o acesso aos vasos sanguíneos e ao embrião é facilitado, podendo os tratamentos ser realizados precocemente, com menos de 20 horas de incubação (Moury e Schoenwolf, 1995).

2.6 Vascularização e morfogênese

Há diversas evidências que estabelecem relações funcionais entre princípios moduladores da formação de vasos sanguíneos e indutores endógenos da forma do corpo do embrião (Aybar e Mayor, 2002; Princivalle e De Agostini, 2002). No embrião de galinha, os primórdios da topografia e os diversos sistemas estabelecem-se rapidamente (em menos de 96 horas de incubação), provendo também uma base razoável para estimativas de toxicidade (Bupp Becker e Shibley, 1998). O aparecimento de determinadas estruturas em um tempo pré-estabelecido foi o critério utilizado pelos pesquisadores Hamburger e Hamilton (1951) para a determinação dos 46 estágios do desenvolvimento de *Gallus domesticus*, correspondendo ao período de incubação de 21 dias, após o qual ocorre a eclosão.

O primeiro indício da presença de vasos sanguíneos (ilhotas sanguíneas) nos ovos de *Gallus domesticus* é observado após 24 horas de incubação (Eyal-Giladi, 1991). As ilhotas sanguíneas consistem em agregados de células endoteliais que têm origem na camada germinativa intermediária do embrião (Hamburger e Hamilton, 1951; Valdes-Dapena e Arey, 1974). No período de 33 horas de incubação, estrutura-se uma rede vascular, onde veias e artérias originadas no coração estabelecem uma circulação vitelínica (Houillon, 1972; Valdes-Dapena e Arey, 1974).

O FGFb é um indutor da angiogênese bem conhecido, que está envolvido também na especificação dos limites do tubo neural durante etapa final da indução da crista neural. Esta estrutura acompanha o crescimento embrionário ao longo dos domínios cefálico-caudal (Dhoot *et al.*, 2001).

Capítulo 3

Objetivos

3.1 Objetivos Gerais

O presente trabalho tem como objetivo comparar os efeitos da administração da aloína e do extrato do parênquima clorofiliano (EPC) sobre a viabilidade das células tumorais de melanoma da linhagem B16F10 e sobre os processos fisiológicos de vasculogênese e angiogênese nas membranas vitelínica (MV) e corioalantóicas (MC) de embriões de *Gallus domesticus*.

3.2 Objetivos específicos

Este trabalho foi organizado a partir das seguintes metas:

- Avaliar *in vitro* a atividade da aloína e do EPC sobre a viabilidade das células de melanoma da linhagem B16F10.
- Quantificar, via modelamento matemático, os parâmetros intrínsecos de toxicidade da aloína e do EPC nas culturas de células de melanoma da linhagem B16F10.
- Avaliar o efeito da aloína e do EPC na formação de vasos sanguíneos primordiais na membrana vitelínica (MV) e na membrana corioalantóica (MC), caracterizando *in vivo* a atividade sobre os processos de vasculogênese e angiogênese.
- Verificar se a aloína e do EPC exercem alterações no crescimento e na morfogênese embrionária (comprimento cefálico-cervical-caudal e percentual de comprimento encefálico).

Capítulo 4

Materiais e Métodos

4.1 Obtenção do Extrato do Parênquima Clorofiliano (EPC)

Folhas de *Aloe barbadensis* foram gentilmente cedidas pela empresa Naturama S.A. (Paulo Lopes, SC) através da parceria desta empresa com o Projeto Bioativos (Com financiamento da FINEP/SEBRAE/CNPq). Inicialmente as folhas foram cortadas em sua base e dispostas em um recipiente protegido da luz e do calor para que o EPC fosse drenado pela ação da gravidade. Após este procedimento, o EPC obtido foi filtrado e armazenado em recipiente âmbar, congelado e posteriormente liofilizado. O material foi obtido e processado no Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (FIT/CCA/UFSC).

4.2 Aloína padrão

A aloína utilizada foi adquirida da Fluka (06088; Riedel-de-Haën; Seelze; Germany), e contém aproximadamente 99 % de aloína, sendo que as principais impurezas são produtos de oxidação.

4.3 Avaliação da bioatividade *in vitro*

4.3.1 Cultura de Células

Nos ensaios *in vitro* foram utilizadas células tumorais da linhagem B16F10 – uma linhagem de melanoma espontâneo de camundongos C57BL/6 selecionadas por Fidler (1973). Estas células são mantidas pelo Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais, do Departamento de Farmacologia – CCB/ UFSC. A metodologia experimental utilizada pode ser visualizada no fluxograma da **Figura 3**.

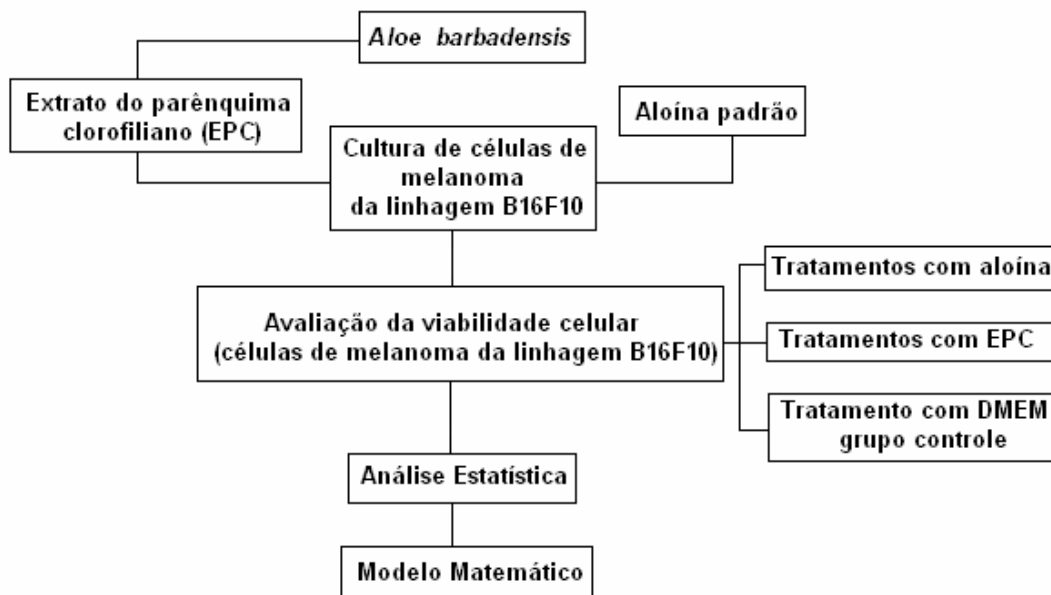


Figura 3. Metodologia aplicada na avaliação da bioatividade da aloína e do extrato do parênquima clorofiliano (EPC) de *A. barbadensis in vitro*

4.3.2 Ensaio de viabilidade celular

O protocolo utilizado neste experimento segue o que foi determinado pelo Órgão Internacional de Padronização (International Standard Organization -ISO 10993), sendo que o ensaio *in vitro* é o primeiro teste para avaliar a bioatividade de qualquer substância para uso em dispositivos biomédicos.

Células de melanoma da linhagem B16F10, na densidade de 2500 células por poço, foram incubadas em placas de cultura de 96 poços, contendo 100 μL por poço de meio Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco, BRL), 2 mM de L-glutamina, 4,5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glucose, 1,5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de bicarbonato de sódio, 10 mL de penicilina e estreptomicina e colocadas em estufa com atmosfera contendo 5% de CO_2 , à temperatura de 37°C. No grupo controle as células foram tratadas apenas com meio de cultura.

Após as 24 horas iniciais de incubação o meio de cultura DMEM foi removido e as células foram tratadas com concentrações crescentes de aloína e extrato do parênquima clorofiliano (EPC). As soluções foram preparadas sob incidência de luz de coloração vermelha, a fim de minimizar os efeitos da degradação da aloína e de compostos antraquinônicos fotossensíveis. Foram utilizadas cinco concentrações de extrato do parênquima clorofiliano (EPC) (0,01, 0,1, 1, 10 e 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), e seis concentrações de aloína (0,01, 0,1, 1, 10, 100, e 230 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), todas solubilizadas em meio de cultura DMEM.

Após 48 horas, as soluções foram removidas dos poços e a cada poço foram adicionados 100 μL de uma solução 5mg.mL de reagente MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazol) em meio de cultura DMEM, a fim de observar a atividade mitocondrial das células viáveis. As células foram novamente incubadas por 2,5 horas à temperatura de 37°C. Logo após a remoção desses reagentes, foram adicionados 200 μL de solução dimetilsulfóxido (DMSO) por poço. A absorbância a 550 nm foi determinada em um leitor de microplacas automático. Os resultados foram expressos em absorbância relativa à máxima densidade óptica (D.O.) observada durante os experimentos com a aloína padrão e EPC, o que corresponde à mesma densidade óptica (D.O.) observada para os poços de solução controle. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais (FMC/CCB/UFSC).

4.3.3 Modelagem Matemática e Computacional

Os resultados obtidos no grupo tratado com aloína padrão, EPC e o grupo controle foram representados através de um modelo matemático e seus parâmetros de toxicidade foram estabelecidos. Os parâmetros de toxicidade foram obtidos por regressão não-linear, pelo Método de Marquardt (Constantinides, 1999). O modelo foi desenvolvido no Laboratório de Tecnologias Integradas, IntelAB (EQA/CTC/UFSC), e analisado com o auxílio de programa escrito em MATLAB® (MathWorks Inc., Natick, MA, USA).

4.4 Avaliação da bioatividade *in vivo*

4.4.1 Ovos de galinha embrionados da espécie *Gallus domesticus*

Ovos de galinha da linhagem Ross, de tamanho padrão médio (aproximadamente 55 g), fertilizados e livres de patógenos específicos, foram fornecidos pela empresa Macedo Koerich (São José, SC), em um período de até 12 horas após a postura. O material foi estocado por 48 horas em câmara fria (19–20°C), até o início da incubação. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Bioatividade e Morfogênese Animal (LEBIMA/BEG/CCB e FIT/CCA/UFSC). O esquema da metodologia utilizada para esta etapa do estudo está apresentado na **Figura 4**.

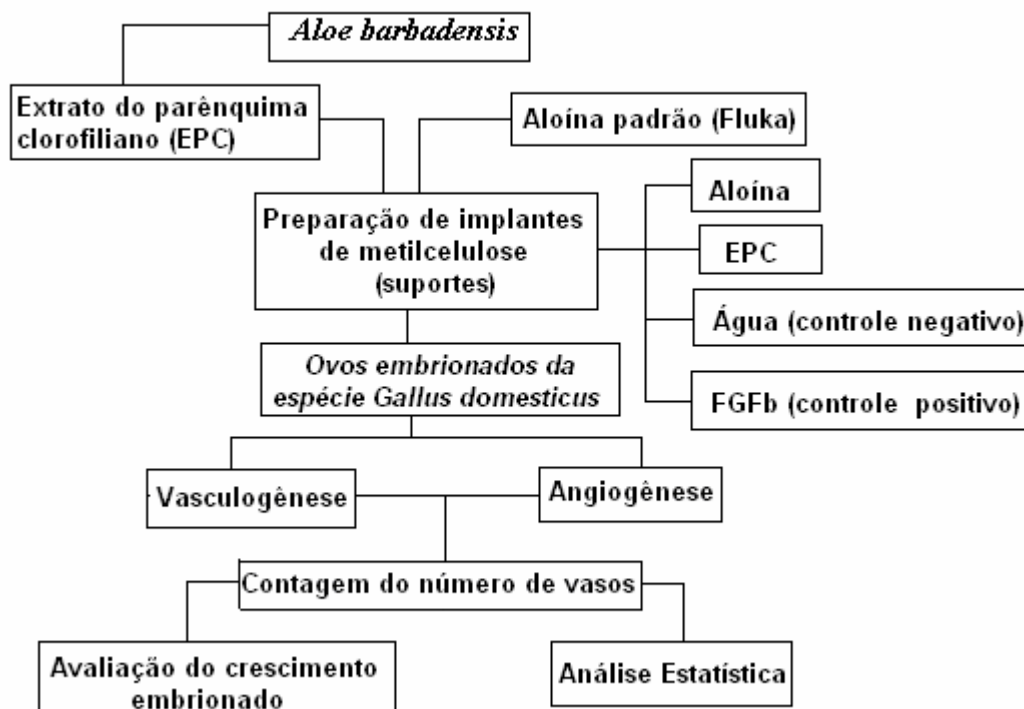


Figura 4. Metodologia experimental aplicada na avaliação da bioatividade da aloína e do extrato do parênquima clorofiliano (EPC) de *A. barbadensis in vivo*.

4.4.2 Ensaio de vasculogênese na vesícula vitelínica do embrião de galinha

Para avaliar a atividade da aloína e do EPC na formação de vasos sanguíneos foi utilizado o método da vesícula vitelínica do embrião de galinha. Este método foi adaptado do ensaio da membrana corioalantóica (CAM Assay), o qual vem sendo utilizado para avaliar a atividade angiogênica (Jakob *et al.*, 1978; McCormick *et al.*, 1984; Crum *et al.*, 1985; Vu *et al.*, 1985; Peek *et al.*, 1988; Nguyen *et al.*, 1994; Dias *et al.*, 2005). Após estocagem prévia em câmara fria, os ovos foram incubados em estufa (Gera-Petersime), à temperatura de 37,5°C equipada com ventilação forçada e controle digitalizado de umidade (33%). Após 48 horas de incubação (dias embrionário - E2, estágio 13-HH; Hamburger e Hamilton, 1951), foi efetuada uma abertura de aproximadamente 10 mm na casca. Esta abertura ocasiona o descolamento entre a membrana interna da casca e a membrana vitelínica possibilitando que o suporte seja implantado sobre esta última. Os tratamentos *in vivo* (n=8) foram realizados por meio de suportes-discóides de metilcelulose (1 disco/embrião), com cerca de 2 mm de diâmetro, implantados na vesícula vitelínica próximo ao embrião, onde ilhotas sanguíneas ainda estavam presentes. Soluções de aloína e de EPC foram absorvidas em suportes de metilcelulose e testadas em 8 concentrações (10, 20, 40, 80, 100, 160, 200, 320 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Para a obtenção dos suportes de metilcelulose, preparou-se uma solução diluída à 0,45% em água destilada estéril. Volumes de 5 μL da solução de metilcelulose, isolada ou em associação com aloína ou extrato do parênquima clorofiliano, foram pipetadas em câmara de fluxo em uma bandeja de teflon para a polimerização dos discos. A avaliação da resposta pró ou anti-vasculogênica foi realizada sob microscópio estereoscópico (20X) e baseou-se na contagem do número de vasos sanguíneos que interceptam o limite do disco de metilcelulose, após os quatro dias de incubação correspondentes ao período total de experimentação (dia embrionário E4; estágio 23-HH; Hamburger e Hamilton, 1951).

Concluídos os procedimentos de incubação, embriões de galinha utilizados nos ensaios de vasculogênese foram dissecados das membranas ovulares,

realizou-se a biometria e mensuração do comprimento, logo após os embriões foram fixados em solução de Bouin. O comprimento embrionário foi expresso em percentagem e realizado através de medidas de comprimento corporal nos segmentos definidos como eixos e flexuras céfalicos - cervical - caudal como mostra a **Figura 5**.

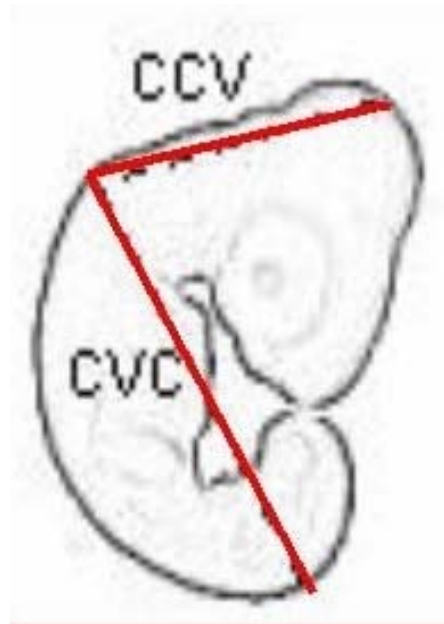


Figura 5. Medidas céfalico cervical (CCV) e cervical caudal (CVC) realizados nos embriões da espécie *G. domesticus*. (Dias et al., 2005)

Para permitir uma avaliação da morfogênese embrionária, a proporção entre as regiões anterior e posterior do embrião foi determinada como mostrado na **Figura 5**. Os eixos de comprimento entre as flexuras céfalica e cervical (CCV) e as flexuras cervical e caudal (CCC), foram relacionados por meio da percentagem de comprimento cefálico (CCV/CCC), i.e, o comprimento da região céfalica em relação ao comprimento total do embrião, calculada através da seguinte expressão: $CCV/CCC: [CCV \div (CCV + CVC)] \times 100$. Os dados obtidos foram submetidos à análise de comparação de médias pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

4.4.3 Ensaio de angiogênese na membrana corioalantóica do embrião de galinha

Para a avaliação do processo de angiogênese foi utilizado o ensaio *in vivo* da membrana corioalantóica e foi executado de acordo com procedimentos previamente descritos (Jakob, *et al.*, 1978; McCormick, *et al.*, 1984; Crum, *et al.*, 1985; Vu, *et al.*, 1985; Peek, *et al.*, 1988; Nguyen, *et al.*, 1994).

A incubação dos ovos foi feita em estufa, à temperatura de 37,5°C, equipada com ventilação forçada e controle digitalizado de umidade (33%) durante os oito dias de experimentação. O procedimento de incubação preliminar e abertura dos ovos foi realizado de acordo com o descrito no item 4.4.2. No sexto dia de incubação (dia embrionário E6; estágio 28/29-HH) os ovos foram retirados novamente da estufa. Os tratamentos (n=8) foram realizados por meio de suportes-discóides de metilcelulose, com cerca de 2 mm de diâmetro (5 µL, 1 disco/embrião), implantados no terço externo da membrana corioalantóica, onde vasos capilares estavam crescendo. Soluções de aloína e EPC foram testadas em quatro concentrações definidas a partir dos ensaios de vasculogênese (40, 80, 160, 320 µg·mL⁻¹).

Imediatamente após os tratamentos, as janelas na casca foram novamente fechadas com filme de celofane preto, e os ovos re-incubados (37,5°C) por mais 48 horas (E8; estágio 34-HH). Concluído o período de 8 dias de incubação, os ovos foram retirados da estufa, e a região do disco de metilcelulose foi examinada em um microscópio estereoscópico. A resposta angiogênica foi determinada em função do número de vasos sanguíneos ao redor do disco de metilcelulose e expressa como percentagem de vasos no limite do disco, em relação ao controle.

4.4.4 Análise de dados e estatística

Em cada grupo experimental, as respostas obtidas nos grupos tratados com aloína e EPC foram sempre avaliados em paralelo com as respostas dos tratamentos como o veículo nos respectivos controles, de modo a minimizar a interferência de possíveis flutuações de responsividade. Os dados foram apresentados como médias ± E.P.M., obtidos de ao menos dois experimentos

independentes. As análises estatísticas foram realizadas através da ANOVA (análise de variância univariada), seguida do método tukey.

As homogeneidades das variâncias e as influências de substâncias, concentrações, bem como de locais de tratamento (in vivo) foram testados e validados. Os efeitos foram considerados estatisticamente significativos para valores de P menores que 0,05 (*).

4.4.5 Bioética

Todos os estudos envolvendo ovos embrionados de *G. domesticus* foram realizados de acordo com os procedimentos impostos pelo NIH (National Institute of Health), assim como pelo Guiding Principles for the Care and Use of Laboratory Animal e definidos no protocolo PP00069/proc.23080.028290/2006/CEUA/UFSC, do Comitê de Ética para o Uso de Animais em Pesquisa (CEUA / UFSC, Florianópolis, SC, Brazil).

Capítulo 5

Resultados e Discussão

5.1 Avaliação da Bioatividade *in vitro*

O EPC obtido da *Aloe barbadensis* e a substância isolada, aloína, foram testados em células de melanoma da linhagem B16F10 com o objetivo de avaliar preliminarmente a atividade antitumoral e/ou a citotoxicidade desses compostos. A **Figura 6** mostra a porcentagem de viabilidade celular em função das crescentes concentrações de aloína e EPC, após 48 horas de tratamento.

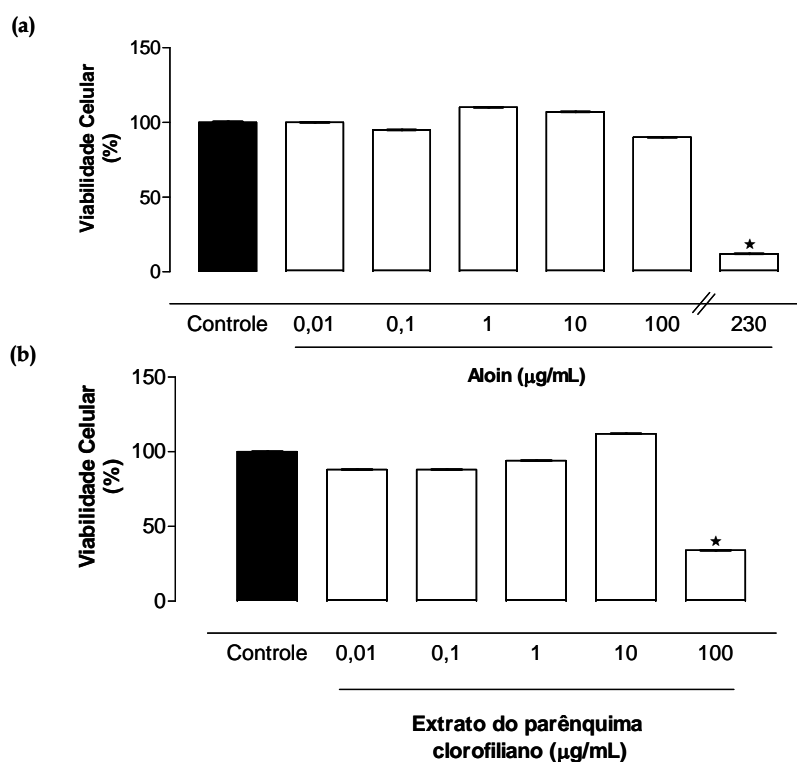


Figura 6. Viabilidade celular em função da concentração de aloína-padrão (0,01- 230 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (a) e extrato do parênquima clorofiliano (EPC) (0,01-100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (b). Os resultados foram expressos em porcentagem do grupo controle (meio de cultura DMEM). * Diferenças significativas ao nível de $P < 0,05$ em relação ao grupo controle (ANOVA seguida do teste de Tukey).

Analisando os resultados apresentados na **Figura 6** observa-se que a aloína e o EPC reduziram a percentagem de células viáveis nas concentrações de 100- 230 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente. Verifica-se que não ocorreram modificações significativas na percentagem de viabilidade celular nos intervalos de concentração de 0,01 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ a 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Na concentração de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ o EPC reduziu a viabilidade celular das células de melanoma da linhagem B16F10 em 65% enquanto a aloína na mesma concentração reduziu em apenas 22%. Verifica-se que a aloína causou a morte das células de forma estatisticamente significativa, em relação ao grupo controle, na concentração de 230 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, reduzindo em 88% a viabilidade celular em relação ao controle.

A morte celular pode ocorrer por mecanismos distintos, (Lockshin e Zakeri, 2001), através desses resultados foi possível constatar que a aloína e de modo mais efetivo o EPC, provocaram a mortalidade nas células da linhagem celular em estudo o que indica uma ação antitumoral específica.

5.1.2 Modelagem matemática

Foi desenvolvido um modelo matemático com o propósito de estimar os parâmetros de toxicidade da aloína e do EPC para células de melanoma da linhagem B16F10, em função do aumento da concentração dos efetores (aloína e EPC). Embora os sistemas biológicos possam ser representados através de modelamento matemático computacional, como no caso de outras áreas das ciências, este não é um procedimento de rotina na área biológica. Os modelos matemáticos podem auxiliar na compreensão e interpretação dos resultados obtidos, e contribuir para um melhor planejamento de experimentos e otimização de recursos. A identificação de parâmetros relevantes pode ser uma vantagem na comparação entre diferentes casos ou diferentes condições de experimentação.

A indução de morte por apoptose tornou-se o principal interesse de muitos estudos voltados para a quimioterapia do câncer. A apoptose é um tipo de morte celular caracterizada pela redução no tamanho da célula, condensação da

cromatina e perda da integridade da membrana plasmática, podendo acontecer em processos normais e fisiopatológicos (Schulze-Osthoff *et al.*, 1994).

Palsson e Bhatia (Palsson e Bhatia, 2004) sugerem que matematicamente o processo de morte celular por necrose e ou apoptose prossegue como um processo de primeira ordem; logo, a morte de uma população de células, X , pode ser descrita por uma equação do tipo:

$$\frac{dX}{dt} = -\alpha X \quad (1)$$

onde, α representa a velocidade específica de morte celular. A morte celular específica pode ser função de vários fatores, especialmente da concentração, c , de um dado efetor. Uma relação funcional em potencial entre a velocidade específica de morte celular e um efetor pode ser expressa da seguinte forma:

$$\alpha(c) = \frac{\alpha_{m\acute{a}x}c}{K_m + c} \quad (2)$$

em que K_m é um equivalente à constante de Michaelis-Menten, ou seja, o valor de concentração para o qual a população celular é destruída em 50%.

Analisando os pontos experimentais e considerando constante a sobrevivência das células para baixas concentrações do efetor, sugere-se a equação (3) como ponto de partida para obtenção do modelo matemático que expressa o comportamento dos dados experimentais:

$$\frac{dX}{dc} = -\frac{1}{ac + b} \quad (3)$$

Como os dados experimentais não variam no tempo e sim com a concentração, a equação (1) pode ser analisada da seguinte forma: rearranjando a equação (1) temos

$$\frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} = -\alpha \quad (4)$$

Mas

$$\frac{dX}{dt} = \frac{dX}{dc} \cdot \frac{dc}{dt} \quad \therefore \quad \frac{dX}{dc} \approx \frac{dX}{dt} \cdot \frac{\Delta t}{\Delta c} \quad (5)$$

Logo,

$$\frac{dX}{dc} = -\alpha \cdot X \cdot \frac{\Delta t}{\Delta c} \quad (6)$$

Como definido anteriormente, a relação entre a velocidade específica de apoptose (com possível contribuição necrótica) e a concentração de um agente efector pode ser representada pela equação (2). Portanto, substituindo a equação (2) na equação (6) temos:

$$\frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dc} = \frac{-\alpha_{max}}{K_m + c} \quad (7)$$

Analisando a equação (7) observa-se que a variação da absorbância (densidade óptica) pode ser definida como $dy = dX / X$, ou seja, está relacionada com a variação da concentração do efector dc e pode ser representada da seguinte forma:

$$\frac{dy}{dc} = -\frac{\alpha_{max}}{K_m + c} \quad (8)$$

Relacionando a equação (3) proposta por (Berti *et al.*, 2007) com a equação (8), encontra-se como definição que $\alpha_{max} = 1/a$ e $K_m = b/a$.

Com base nas observações experimentais e no modelo de morte celular por apoptose sugerido em Palsson e Bhatia (2004), foi desenvolvido o seguinte modelo para a morte celular provocada pela toxicidade de aloína e de outras substâncias presentes no EPC de *Aloe barbadensis*, ao final de 48 h de exposição aos efetores:

$$\frac{dX}{dc} = \frac{\delta_{max}}{c - K_\delta} \quad (9)$$

onde δ_{max} é a variação máxima da população celular (isto é, morte celular) em função da concentração do(s) efector(es), expressa em densidade óptica relativa; K_δ é uma singularidade do modelo ($0 \leq c < K_\delta$), e representa a concentração de efector para a qual ocorre 100% de morte celular.

Utilizando-se como condição de contorno para a equação (9) os valores de densidade óptica relativa igual à unidade (para o qual $c=0$), que são correspondentes a 2.500 células de melanoma em um tempo 24 h antes do início dos experimentos ($t=0$), obtém-se a seguinte solução analítica:

$$X = 1 - \delta_{max} \cdot \ln\left(\frac{c}{K_{\delta}} - 1\right) \quad (10)$$

As **Figuras 7 e 8** mostram curvas representativas de morte celular em função do aumento da concentração da aloína e do EPC, respectivamente.

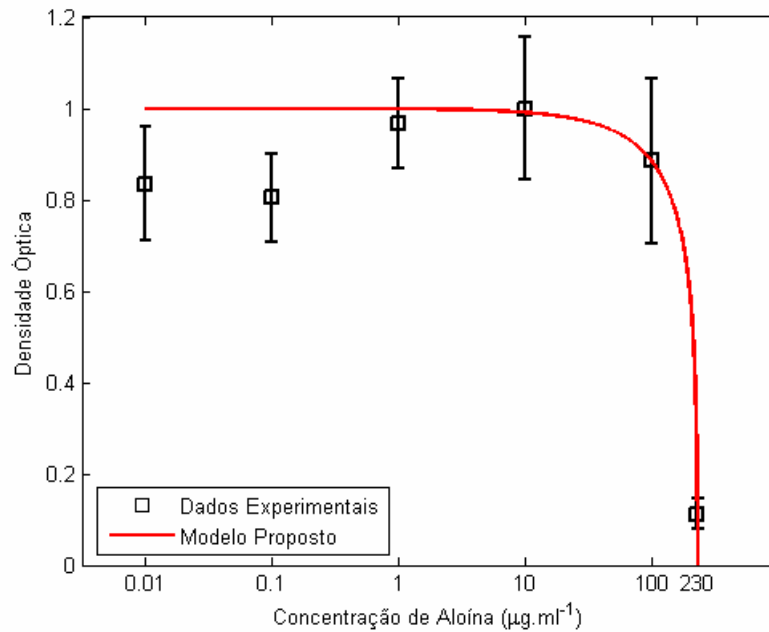


Figura 7. Curva representativa de morte celular em função da concentração de aloína, após 48 h de exposição ao efetor. Os dados experimentais representam médias de oito experimentos (poços) para cada condição de concentração.

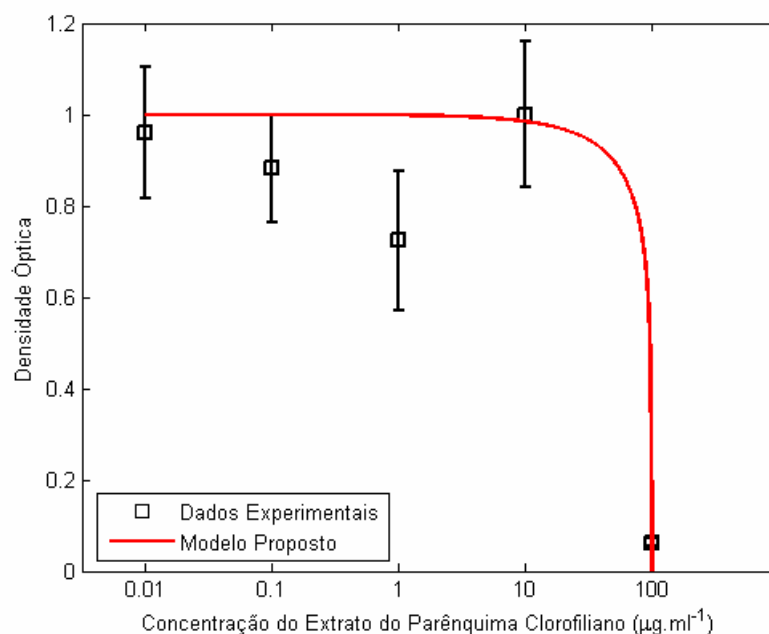


Figura 8. Curva representativa de morte celular em função da concentração do extrato do parênquima clorofiliano (EPC), após 48 h de exposição. Os dados experimentais representam médias de oito experimentos (poços) para cada condição de concentração.

As **Figuras 7 e 8** mostram que tanto para o caso da toxicidade da aloína padrão quanto para o EPC da *A. barbadensis*, observa-se uma queda brusca no número de células em função de uma determinada concentração crítica do agente efetor. Em ambas figuras, os dados de concentração estão graficados em escala logarítmica. Até a concentração de $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ praticamente não foi observada morte celular. Contudo, é importante salientar que a densidade óptica registrada diz respeito ao número total de células, das quais uma fração foi oriunda de novas células que se originaram por proliferação a partir das células semeadas no início da cultura. Variações importantes de densidade óptica também ocorrerem para um mesmo conjunto de experimentos, isto é, nos oito poços de cada concentração de efetor, utilizado em cada uma das placas de 96 poços. É importante salientar que os desvios-padrão mostraram-se elevados, sobretudo para baixas concentrações das substâncias em estudo.

Para a obtenção dos parâmetros do modelo não foram considerados os três pontos experimentais iniciais, que foram tomados como constantes no intervalo $0,01$ a $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Mesmo que as diferenças tenham ocorrido, embora não sendo

estatisticamente significativas, estas parecem reproduzir dinamicamente o comprometimento da célula em se dividir (mitoses), aumentando a densidade celular de forma desproporcional e refletindo, provavelmente, nos eventos de proliferação celular. Isto explica, em parte, o grande desvio do parâmetro K_{δ} . Portanto, nas baixas concentrações, não foram verificados efeitos citotóxicos significativos produzidos pelos produtos de *Aloe barbadensis* testados.

A **Tabela 1** mostra os parâmetros obtidos por regressão não-linear, pelo Método de Marquardt (Constantinides e Mostoufi, 1999), a partir da equação (9).

Tabela 1. Parâmetros de toxicidade celular, obtidos por regressão não-linear do modelo proposto, Equação (9), considerando-se constantes os valores experimentais iniciais de densidade óptica até a concentração de $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Efetor	Parâmetro de toxicidade *	
	δ_{max}	K_{δ}
Aloína padrão	$0,205 \pm 0,009$	233 ± 9
EPC	$0,15 \pm 0,09$	100 ± 58

* Os valores são reportados como a média de oito experimentos \pm desvio padrão.

Os dados da **Tabela 2** representam a concentração dos efetores (aloína e EPC) para diferentes níveis de morte celular, expressos como percentagem do número de células inicialmente presentes. Esses parâmetros, juntamente com os parâmetros do modelo matemático proposto, podem ser utilizados como referência ou critério para avaliar a citotoxicidade de outros efetores.

Tabela 2. Valor crítico de concentração do efetor para morte celular determinado a partir do modelo matemático proposto.

% Morte celular	Concentração de aloína, $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	Concentração do EPC, $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	Razão de Toxicidade (EPC/A)*
10	157	50	3,1
25	196	82	2,4
50	222	97	2,3
100	231	100	2,3

*Os valores de razão de citotoxicidade foram calculados dividindo-se as concentrações de aloína e de extrato do parênquima clorofiliano.

Utilizando-se como critério os valores de K_s ou o percentual de morte celular total, é possível concluir que o extrato é 2,3 vezes mais citotóxico do que a aloína padrão utilizada. Uma vez que o EPC é constituído majoritariamente de aloína, e em menor grau por outras antraquinonas, assim como a aloe emodina (Campestrini, 2007), sugere-se que a atividade biológica do EPC, neste caso a indução de morte celular, se deve a um sinergismo de compostos bioativos (por ex., antraquinonas), mais do que o efeito de um único composto em particular, (Davis, 1997). Corroborando essas evidências encontra-se na literatura diversos relatos de que a aloe emodina isoladamente causou a morte de células de hepatoma humano da linhagem HepG2 (Graham *et al.*, 2000) e Hep3B (Kuo *et al.*, 2002), assim como a morte de células de carcinoma de pulmão humano da linhagem CH27 (Hsu *et al.*, 1999; Shinoura *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2001), induzindo a fragmentação do DNA nas células tumorais (Lee *et al.*, 2001). Além disso, Pecere e colaboradores (2000) relatam que a aloe emodina, por exemplo, possui toxicidade seletiva para tumores neuroectodérmicos, com poucos efeitos adversos em células normais. Por outro lado, nenhum relato sobre o efeito da aloína e do EPC sobre a viabilidade celular *in vitro* foi encontrado na literatura. Desse modo é possível que o pronunciado efeito do EPC na morte de células tumorais, ocorra em função da presença das duas principais antraquinonas (aloína e aloe emodina).

5.2 Avaliação da bioatividade *in vivo*

Neste estudo, inicialmente foi investigada a atividade da aloína e do EPC no processo de vasculogênese da membrana vitelínica (MV) de embriões de *G. domesticus*, considerando-se os eventos primordiais da vascularização. A **Figura 9** mostra a percentagem do número de vasos em função da concentração de aloína e do EPC no período de tratamento de quatro dias de desenvolvimento embrionário.

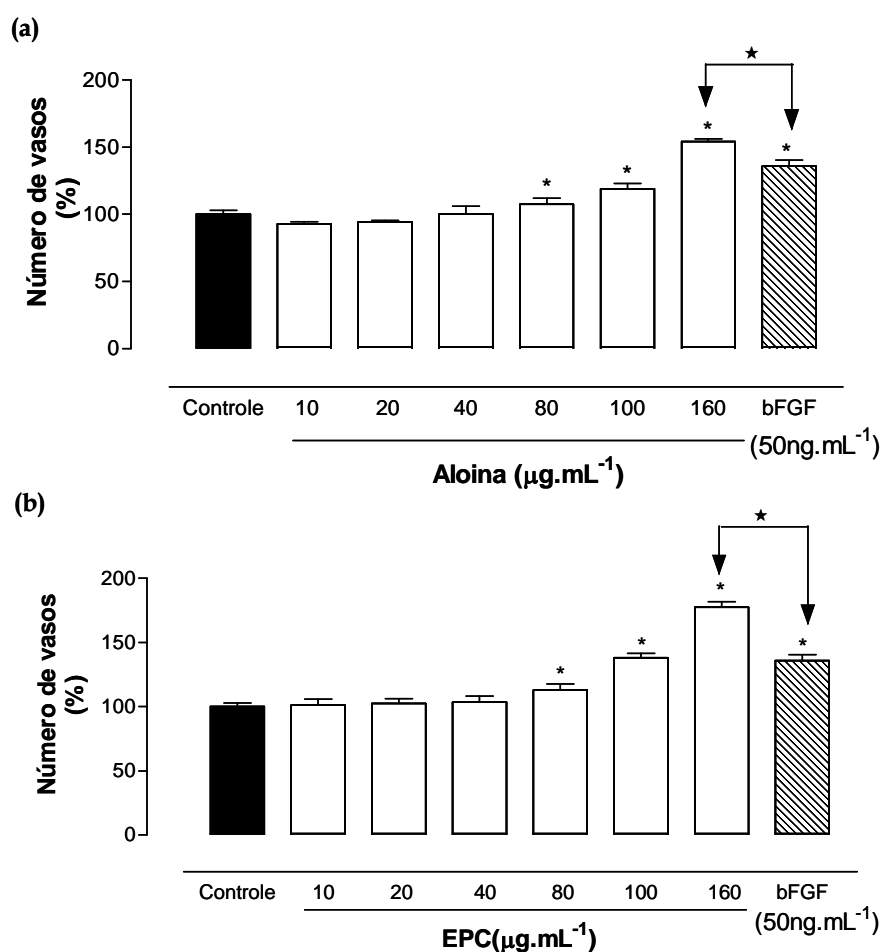


Figura 9. Percentagem do número de vasos em função da concentração da aloína **(a)** e do extrato do parênquima clorofiliano (EPC) **(b)** na vasculogênese de embriões de *Gallus domesticus* com quatro dias de desenvolvimento. * Diferenças significativas ao nível de $P < 0,05$, em relação ao grupo controle (ANOVA seguido do teste Tukey).

Analisando a **Figura 9** verifica-se que tanto a aloína como o EPC estimularam de forma dose dependente a vasculogênese. A **Figura 9a** mostra a percentagem do número de vasos em função da concentração de aloína. Observa-se que enquanto o grupo controle desenvolveu uma média de 108 (100%) vasos vitelínicos primários no limite dos discos, os grupos tratados com aloína (80 -160 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) mostraram um aumento de 119 - 154 %. Outra observação importante é que na maior concentração, de 160 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, a aloína foi significativamente mais efetiva (154%) que o observado nos grupos tratados com fator angiogênico FGFb (50ng.mL - 135% de vasos).

A **Figura 9b** mostra a porcentagem do número de vasos em função da concentração de EPC. Analisando a **Figura 9b** verifica-se que enquanto o grupo controle desenvolveu uma média de 108 (100%) vasos vitelínicos primários no limite dos discos, os grupos tratados com EPC (80 - 160 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) mostraram até 138% - 177%. Observa-se que na concentração de 160 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ o EPC foi significativamente mais efetivo (177%) que o FGFb (135% de vasos). Logo, o EPC foi mais significativo que a aloína em relação ao estímulo à vasculogênese em concentrações até 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, o nível de estímulo à vasculogênese deu-se de forma dependente da concentração.

Exclusivamente nas concentrações de 200 e 320 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, ocorreu mortalidade embrionária em 100% tanto para os grupos tratados com aloína, quanto para aqueles tratados com EPC.

Algumas espécies de *Aloe barbadensis* são conhecidas por suas significativas propriedades cardiovasculares (Farnsworth e Thai, 1992). O processo de vasculogênese é importante no contexto do desenvolvimento de novas terapias celulares, em razão da indução da vascularização, o que poderia colaborar no controle de isquemias (Halliday *et al.*, 2002), ou mesmo, na manutenção de vasos viáveis, em tumores, em condições próprias para veicularem quimioterápicos por exemplo.

Com o objetivo de avaliar a possível influência do efeito vasculogênico da aloína e do EPC na morfogênese e no crescimento embrionário, foram obtidas as medidas de comprimento cefálico-cervical-caudal (total) dos embriões após os quatro dias de desenvolvimento. As **Figuras 10 e 11** mostram a porcentagem do crescimento encefálico e do comprimento total em função da concentração da aloína e do EPC.

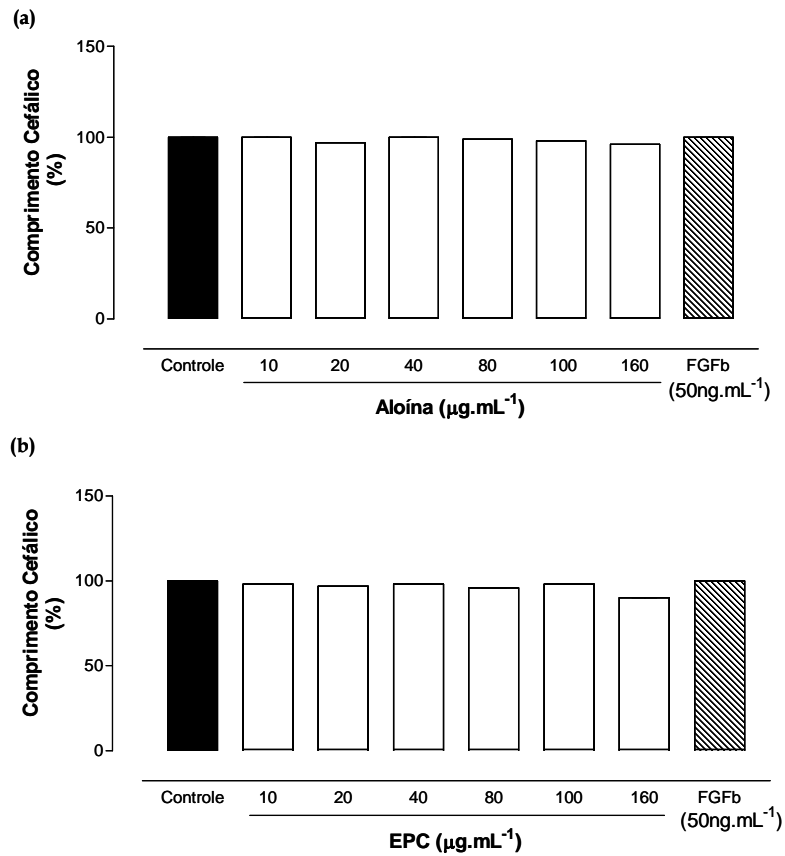


Figura 10. Percentagem de comprimento cefálico (segmento corpóreo CCV) em função da concentração da aloína **(a)** e do extrato do parênquima clorofiliano (EPC) **(b)** na morfogênese de embriões de *Gallus domesticus* com quatro dias de desenvolvimento.

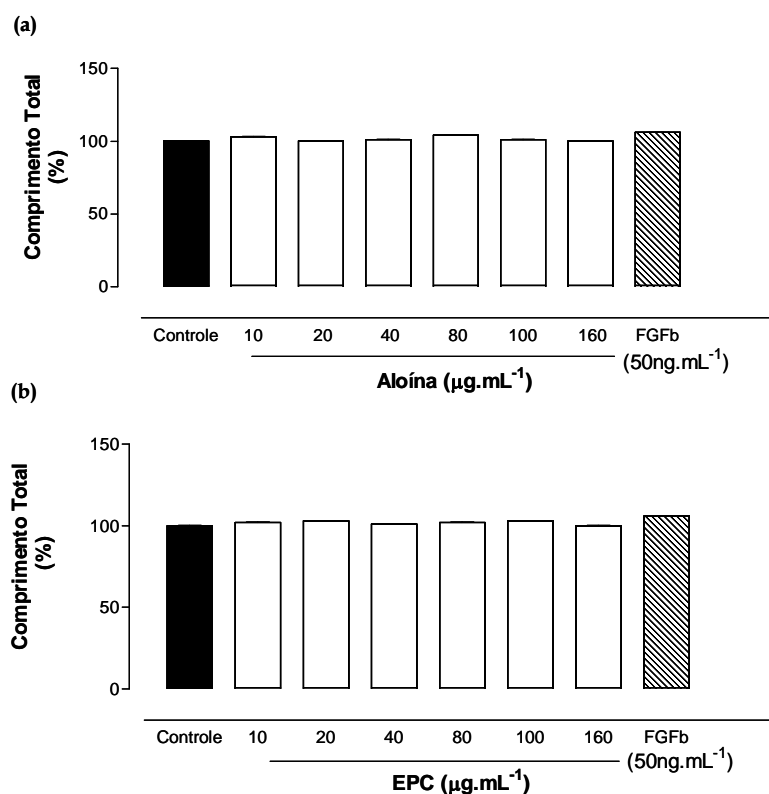


Figura 11. Percentagem do comprimento total (cefálico- cervical- caudal) em função da concentração de aloína **(a)** e do extrato do parênquima clorofiliano (EPC) **(b)** na biometria de embriões de *Gallus domesticus* com quatro dias de desenvolvimento.

Analisando-se as **Figuras 10** e **11** observa-se que a aloína e o EPC não exerceram modificações significativas sobre a morfogênese e o crescimento corporal dos embriões, respectivamente, em relação ao grupo controle.

De acordo com Aybar e Mayor (2002) o fator angiogênico FGFb constitui um morfógeno que pode atuar na especificação do tubo neural de embriões de galinha. Esses autores afirmam que a função do FGFb está relacionada à indução da crista neural (um tecido cujo ritmo de diferenciação acompanha o desenvolvimento embrionário ao longo dos domínios cefálico e caudal). Contudo no presente estudo, a administração de FGFb não foi capaz de modificar o padrão de morfogênese expresso pela percentagem do comprimento cefálico e não produziu qualquer outro efeito negativo aparente sobre os embriões. Estes resultados indicam que a aloína e o EPC, por si só, não exerceram efeito nos mecanismos de crescimento embrionário e/ou que este processo é estritamente

regulado no organismo, como evidenciam os resultados do tratamento como o FGFb.

O ensaio da angiogênese na membrana corioalantóica (MC) é um modelo *in vivo* amplamente utilizado para estudar o desenvolvimento de vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes em embriões (Jakob *et al.*, 1978; McCormick *et al.*, 1984; Vu *et al.*, 1985; Strick *et al.*, 1991; Nguyen *et al.*, 1994; Iruela-Arispe *et al.*, 1995). A **Figura 12** mostra a porcentagem do número de vasos em função da concentração da aloína e do EPC em embriões com oito dias de desenvolvimento.

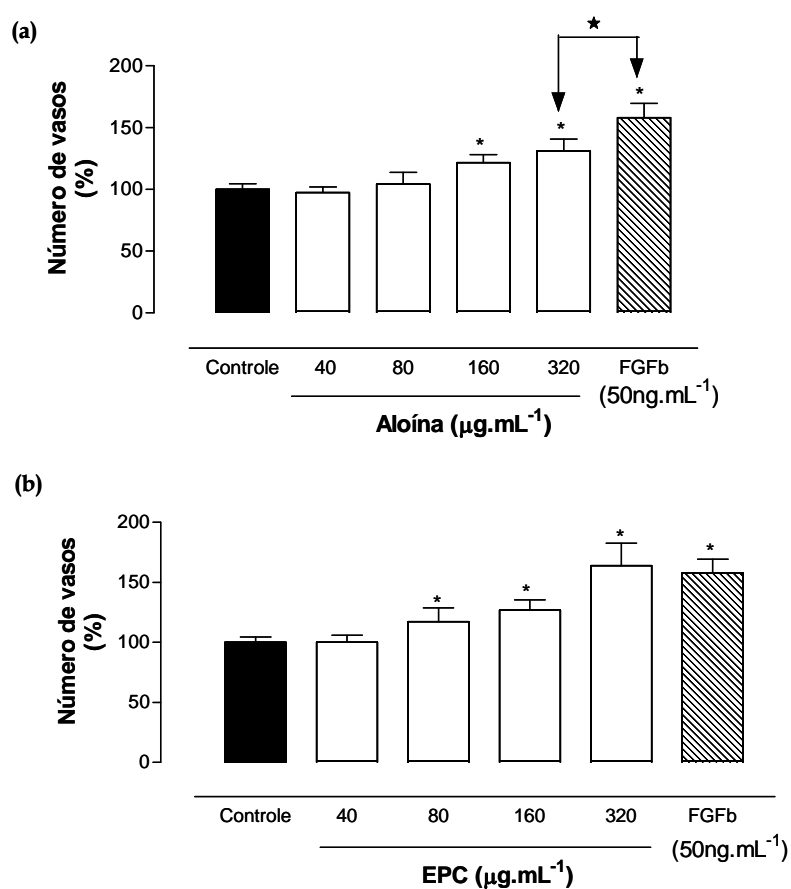


Figura 12. Porcentagem do número de vasos em função da concentração da aloína (a) e do extrato do parênquima clorofiliano (EPC) (b) na angiogênese de embriões de *Gallus domesticus* com oito dias de desenvolvimento. * Diferenças significativas ao nível de $P < 0,05$, em relação ao grupo controle (ANOVA seguido do teste de Tukey).

Analisando a **Figura 12** verifica-se que tanto a aloína como o EPC estimularam de forma dose dependente a angiogênese.

A **Figura 12a** mostra a porcentagem do número de vasos em função da concentração de aloína. Observa-se ainda que enquanto o grupo controle desenvolveu uma média de 136 vasos (100%) nos limites dos discos implantados na membrana corioalantóica (MC), os grupos tratados com aloína (160 e 320 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) mostraram um aumento de 121% e 131%. Além disso a aloína na maior concentração testada, 320 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (131%) apresentou diferenças significativas em relação ao FGFb (158%), mas não equiparou-se ao efeito desse conhecido fator angiogênico, como ocorreu na vasculogênese.

A **Figura 12b** mostra a porcentagem do número de vasos em função da concentração de EPC. Analisando a **Figura 12b** verifica-se que enquanto o grupo controle desenvolveu uma média de 136 vasos (100%) nos limites dos discos implantados na membrana corioalantóica (MC), os grupos tratados com EPC (160 e 320 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) mostraram até 127 e 165% de indução. Observa-se que na concentração de 320 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (165%) o EPC foi mais efetivo do que o FGFb (158%). Verifica-se ainda na **Figura 12** que o efeito angiogênico do EPC foi significativo em 3 das 4 concentrações testadas, enquanto que nos tratamentos realizados com a aloína, as respostas foram significativas em apenas 2 das concentrações. Isto demonstra uma maior efetividade de indução da angiogênese do EPC em relação a aloína.

No todo, a **Figura 12** mostra que tanto a aloína como EPC induziram de modo dose dependente, a formação de vasos capilares na MC, similarmente ao observado nos resultados do ensaio da MV (vasculogênese), como representado na **Figura 9**.

É importante ressaltar que o efeito do FGFb (50 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) foi mais pronunciado na angiogênese (158%) do que na vasculogênese (135%). Diferenças significativas em relação ao FGFb (50 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) foram observadas quando comparados os efeitos da aloína e do EPC (160 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) na vasculogênese, enquanto que na angiogênese observou-se diferenças em relação ao FGFb apenas para a aloína (320 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Esses resultados mostraram que o EPC é mais efetivo que a aloína na formação de vasos sangüíneos, tanto na vasculogênese como na angiogênese. Isto é compatível com a idéia apresentada nos resultados *in vitro*, de

que deve existir no EPC componentes com atividades pró-vasculo/angiogênica que atuam de forma independente ou sinergisticamente com a aloína.

Complementando a avaliação da porcentagem de vasos sanguíneos realizada visualmente, foram obtidas imagens fotográficas, através de microscópio estereoscópico, da membrana corioalantóica (MC) dos embriões com os respectivos tratamentos. A **Figura 13** mostra as imagens obtidas experimentalmente na avaliação da formação de vasos sanguíneos na angiogênese da MC.

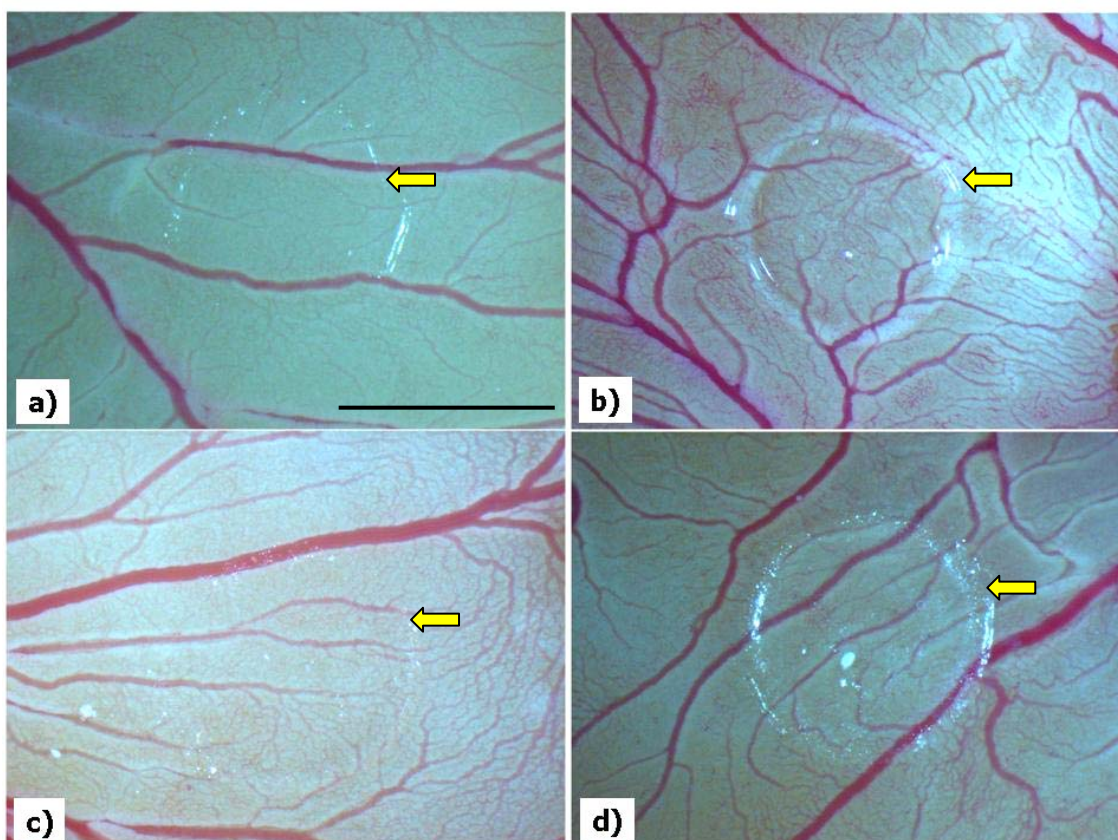


Figura 13. Imagens fotográficas da MC em microscópio estereoscópico destacando os discos de metilcelulose (setas) e os vasos sanguíneos em magenta: **a)** controle (veículo), **b)** FGFb (controle positivo, 50ng.mL⁻¹), **c)** aloína (160µg.mL⁻¹) e **d)** EPC (160µg.mL⁻¹). Aumento: barra (2,5mm).

Avaliação quantitativa foi realizada através de análise de imagem (Image Tool, UTHSCSA for Windows, v.3.0). Fotografias de regiões representativas das amostras foram selecionadas e tratadas no software de modo a evidenciar os vasos em contraste com o fundo. Para isso, a tonalidade magenta foi intensificada de maneira análoga em todas as amostras, como mostra a **Figura 13**. A **Figura 13a** apresenta uma amostra controle tratada com metilcelulose (veículo) e, como

comparativo a Figura **13b** mostra uma amostra tratada com fator de crescimento FGFb (controle positivo, 50ng.ml⁻¹), evidenciando uma formação visualmente maior de vasos em relação ao controle. As fotografias foram então binarizadas e foi feita a contagem de pixels pretos (diretamente proporcional ao número de vasos que interceptam o limite dos implantes) revelou que houve maior formação de vasos nas amostras tratadas com EPC em relação ao controle e em relação aos grupos tratados com aloína. A **Tabela 3** mostra os resultados da contagem do número de vasos que interceptam o limite dos discos implantados, através dois métodos distintos.

Tabela 3: Resultados da contagem de vasos através dos métodos de análise de visual e por pixels.

Amostra	Método de contagem	
	Análise de Imagem	Visual
Controle (veículo)	100%	100%
Aloína (160µg.mL ⁻¹)	122%	121%
Extrato (160µg.mL ⁻¹)	137%	127%
FGFb (50ng.mL ⁻¹)	151%	158%

Analisando a **Tabela 3** percebe-se que os resultados obtidos pelo método de pixels corroboram com a contagem realizada manualmente. A contagem do número de vasos sanguíneos nos grupos tratados com EPC apresentou maiores diferenças entre os dois métodos analisados, mesmo assim confirmam os resultados observados e avaliados visualmente.

Avaliando os resultados obtidos nos experimentos *in vivo* é possível averiguar que, uma vez que concentrações elevadas de aloína e EPC (maiores que 80µg.mL⁻¹ e menores que 200µg.mL⁻¹) não só não provocaram qualquer dano aparente aos embriões, como promoveram a formação de vasos sanguíneos, sugerindo que o tipo de morte celular induzida sobre as células tumorais seja apoptótico, conforme o indicado anteriormente pelo modelo matemático desenvolvido.

Barrantes e Guinea (2003), buscando esclarecer a ação bioquímica e identificar os constituintes ativos das frações de *A. vera*, realizaram ensaios com colagenase microbiana de *Clostridium histolyticum* e com metaloproteinases de leucócitos humanos. Esses autores extraíram da *A. vera* uma fração rica em antraquinonas (aloína, aloesina, aloeresina, aloe emodina) que apresentou atividade enzimática inibitória. Para efeito de comparação, a aloína comercial foi igualmente avaliada e apresentou um efeito dose dependente na inibição das colagenases de *Clostridium histolyticum* (Barrantes e Guinea, 2003). Estes últimos autores sugerem ainda que talvez a aloína possa interagir com os sítios ativos da enzima, sem alterar a afinidade da mesma pelo substrato.

Outra suposição apresentada é de que as antraquinonas presentes na fração da *A. vera* possam interagir com os íons Ca^{2+} diminuindo a sua disponibilidade no meio intracelular. Essa interação não ocorre com os sítios ativos do Zn^{2+} (Scozzafava *et al.*, 2000; Scozzafava e Supuran, 2000a; 2000b), sendo que a aloína apresenta pouca atividade inibitória sobre estes íons. Os mecanismos da inibição da aloína sobre as metaloproteinases (MMPs) não são conhecidos, ainda que muitas moléculas em diferentes tipos celulares tenham sido identificados como alvos potenciais. No entanto, a aloína é um composto estruturalmente similar à tetraciclina, a qual é um conhecido inibidor de MMPs (Barrantes e Guinea, 2003). A doxiciclina, um derivado da tetraciclina (composto quimicamente modificado), exerce um potente efeito inibitório sobre as moléculas de MMPs de células de granulócitos humanos (Greenwald *et al.*, 1998). O mecanismo inibitório da doxiciclina em moléculas de MMPs sugere que aquele fármaco interage com íons Zn^{2+} e Ca^{2+} nos sítios secundários de metaloproteinases, desestabilizando a estrutura dessa enzima (Smith *et al.*, 1999). Os processos de formação de vasos sanguíneos ocorrem por meio de uma série de etapas, as quais podem ser divididas em: fase da desestabilização, fase da migração e proliferação e, por último, fase de maturação da membrana basal (Bouis *et al.*, 2006).

A atividade das metaloproteinases de matriz (MMPs) é auto-regulada por inibidores de metaloproteinases (TIMPs), sendo a expressão de MMPs e de TIMPs muito baixa ou mesmo ausente em tecidos normais; contudo, essa atividade é

incrementada (up-regulated) em situações de angiogênese tanto fisiológica como patológica (Brand, 2002; Bouis *et al.*, 2006). As metaloproteinases de matriz podem ser bloqueadas por inibidores sintéticos (batimastat e marimastat) (Hidalgo e Eckhardt, 2001; Bouis *et al.*, 2006); ainda que a inibição da angiogênese nesses casos tenha sido demonstrada, a inibição das metaloproteinases (MMP) pode levar ao aumento das metástases (Zucker *et al.*, 2000; Kruger *et al.*, 2001).

Metaloproteinases podem atuar na via de ativação da angiogênese, por meio da remoção de fatores de crescimento angiogênicos como o FGFb, utilizado neste estudo, e de seus sítios de ligação na matriz (ECM). Alternativamente, MMPs pode exercer ação anti-angiogênica ao dificultarem a maturação dos vasos, lisando fatores angiogênicos ou mesmo contribuindo para a agregação de fatores anti-angiogênicos, como a angiostatina (Cornelius *et al.*, 1998; Bouis *et al.*, 2006). Portanto, dependendo do contexto, os inibidores de metaloproteinases como os TIMPs, neste caso supostamente a aloína e o EPC, poderiam mostrar tanto atividade anti como pró vasculo/angiogênica (Bouis *et al.*, 2006).

Capítulo 6

Conclusões e Sugestões

- É possível concluir que a aloína e o EPC possuem ação antitumoral, contudo somente em concentrações maiores que $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.
- O EPC mostrou-se 2,3 vezes mais efetivo em causar morte celular do que a aloína-padrão. O modelo matemático desenvolvido evidenciou o efeito citotóxico dessas substâncias, e permitiu a identificação de parâmetros citotóxicos.
- O EPC foi mais efetivo que a aloína em promover a formação de vasos sanguíneos iniciais (vasculogênese) na membrana vitelínica (MV) de embriões com quatro dias de desenvolvimento, apresentando indução superior à do FGFb.
- O EPC e a aloína promoveram a angiogênese na membrana corioalantóica (MC) de embriões com oito dias de desenvolvimento. Por outro lado o EPC foi mais potente que a aloína em transpor o efeito do FGFb.
- Alterações aparentes na morfogênese dos embriões tratados com aloína e EPC não foram observadas, o que mostra a ausência de embriotoxicidade dessas substâncias.
- O EPC e a substância isolada, aloína, mostraram efeito inibitório especificamente sobre células tumorais, enquanto promoveram a proliferação e migração de células normais, com base no estímulo verificado sobre a formação de vasos sanguíneos. Isso sugere que a morte celular dos ensaios *in vitro* tenha ocorrido por apoptose.
- O efeito mais pronunciado do EPC tanto nos ensaios *in vitro* como nos *in vivo* sugere que algum composto ativo presente no EPC esteja agindo sinergisticamente com a aloína.

Sugestões para trabalhos futuros

- Estudos com culturas de células endoteliais e explantes de cordão umbilical humano *in vitro* devem ser realizados para avaliar a toxicidade da aloína e do EPC em cultura de células não tumorais avaliando também o efeito desses compostos sobre a migração e proliferação celular *in vitro*.
- Ensaio de biologia molecular podem auxiliar e ampliar os conhecimentos a respeito do padrão de expressão proteica nas células em contato com os compostos testados, sendo que poderão ser identificadas mudanças na expressão de proteínas.
- Pesquisas com o objetivo de incorporação desses compostos em *scaffolds* bi e/ou tridimensionais devem ser realizadas visando a obtenção de implantes farmacologicamente ativos.
- Determinações através de um modelo matemático os parâmetros que expressem o comportamento da aloína e do EPC na formação de vasos sanguíneos.
- Ensaio *in vitro* que determinem a forma, a porosidade e a estrutura tubular dos vasos sanguíneos induzidos pela aloína e o EPC devem ser realizados para confirmar se os vasos formados apresentam capacidade suficiente para suportar o fluxo contínuo de sangue em seu interior, para que os medicamentos cheguem até a enfermidade de forma confiável.

Referências Bibliográficas

- AGOCHA, A., H. W. LEE, M. EGHBALI-WEBB. Hypoxia regulates basal and induced DNA synthesis and collagen type I production in human cardiac fibroblasts: effects of transforming growth factor-beta1, thyroid hormone, angiotensin II and basic fibroblast growth factor. *J Mol Cell Cardiol*, v.29, n.8, Aug, p.2233-44. 1997.
- ALVES, D. S., L. PEREZ-FONS, A. ESTEPA, V. MICOL. Membrane-related effects underlying the biological activity of the anthraquinones emodin and barbaloin. *Biochem Pharmacol*, v.68, n.3, Aug 1, p.549-61. 2004.
- APLIN, A. E., A. HOWE, S. K. ALAHARI, R. L. JULIANO. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol Rev*, v.50, n.2, Jun, p.197-263. 1998.
- ARAÚJO, P. S., J. M. O. D. SILVA, C. A. NECKEL, C. LANSSEN, A. C. OLTRAMARI, R. PASSOS, E. TIEPO, D. B. BACH, M. MARASCHIN. Micropropagação de babosa (Aloe vera - Liliaceae). *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, v.25, p.54-57. 2000.
- AYBAR, M. J., R. MAYOR. Early induction of neural crest cells: lessons learned from frog, fish and chick. *Curr Opin Genet Dev*, v.12, n.4, Aug, p.452-8. 2002.
- BARRANTES, E., M. GUINEA. Inhibition of collagenase and metalloproteinases by aloins and aloe gel. *Life Sci*, v.72, n.7, Jan 3, p.843-50. 2003.
- BERGERS, G., L. E. BENJAMIN. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature Reviews Cancer*, v.3, n.6, Jun, p.401-410. 2003.
- BERGERS, G., D. HANAHAN, L. M. COUSSENS. Angiogenesis and apoptosis are cellular parameters of neoplastic progression in transgenic mouse models of tumorigenesis. *Int J Dev Biol*, v.42, n.7, p.995-1002. 1998.
- BERTI, F. V., R. A. N. PÉRTILE, J. M. SIQUEIRA-JUNIOR, R. M. RIBEIRO-DO-VALLE, P. F. DIAS, L. M. PORTO. Estudo in vitro do Efeito Anti-tumoral da Aloína em Cultura de Células de Melanoma. *Exacta*, v.5, n.1, jan/jun 2007, p.169-176. 2007.
- BOUIS, D., Y. KUSUMANTO, C. MEIJER, N. H. MULDER, G. A. HOSPERS. A review on pro- and anti-angiogenic factors as targets of clinical intervention. *Pharmacol Res*, v.53, n.2, Feb, p.89-103. 2006.
- BRAND, K. Cancer gene therapy with tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs). *Curr Gene Ther*, v.2, n.2, May, p.255-71. 2002.
- BUPP BECKER, S. R., I. A. SHIBLEY, JR. Teratogenicity of ethanol in different chicken strains. *Alcohol Alcohol*, v.33, n.5, Sep-Oct, p.457-64. 1998.

CALIXTO, J. B., D. A. CABRINI. Herbal medicine catuama induces endothelium-dependent and -independent vasorelaxant action on isolated vessels from rats, guinea-pigs and rabbits. *Phytotherapy Research*, v.11, n.1, Feb, p.32-38. 1997.

CAMPESTRINI, L. H. Aloe barbadensis Miller: Análise do perfil metabólico e dos efeitos vasculogênicos e angiogênicos do extrato do parênquima de reserva, da fração polissacarídica (FP) e da acemanana. (Dissertação). Biotecnologia, UFSC, Florianópolis, 2007. 79 p.

CARMELIET, P., R. K. JAIN. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, v.407, n.6801, Sep 14, p.249-57. 2000.

CARMICHAEL, J., W. G. DEGRAFF, A. F. GAZDAR, J. D. MINNA, J. B. MITCHELL. Evaluation of a Tetrazolium-Based Semiautomated Colorimetric Assay - Assessment of Chemosensitivity Testing. *Cancer Research*, v.47, n.4, Feb 15, p.936-942. 1987.

CARRASCO, R., M. PEREZ-MATEO, A. GUTIERREZ, A. ESTEBAN, M. J. MAYOL, J. CATURLA, P. ORTIZ. Effect of different doses of S-adenosyl-L-methionine on paracetamol hepatotoxicity in a mouse model. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, v.22, n.10, Dec, p.737-740. 2000.

CHOI, S., M. H. CHUNG. A review on the relationship between Aloe vera components and their biologic effects. *Seminars and Integrative Medicine*, v.1, p.53-62. 2003.

CHOW, J. T. N., D. A. WILLIAMSON, K. M. YATES, W. J. GOUX. Chemical characterization of the immunomodulating polysaccharide of Aloe vera L. *Carbohydrate Research*, v.340, n.6, May 2, p.1131-1142. 2005.

CHUNG, J. H., J. C. CHEONG, J. Y. LEE, H. K. ROH, Y. N. CHA. Acceleration of the alcohol oxidation rate in rats with aloin, a quinone derivative of Aloe. *Biochemical Pharmacology*, v.52, n.9, Nov 8, p.1461-1468. 1996.

CHUNG, J. H., J. C. CHEONG, K. S. PARK, H. K. ROH, Y. N. CHA. Effect of aloin, a quinone derivative of aloe, on ethanol metabolism in the rat. *Medical Science Research*, v.24, n.6, Jun, p.421-423. 1996.

CONSTANTINIDES, A. M., N. . **Numerical methods for chemical engineers with MATLAB applications.** . New Jersey: Prentice Hall. 1999

CORNELIUS, L. A., L. C. NEHRING, E. HARDING, M. BOLANOWSKI, H. G. WELGUS, D. K. KOBAYASHI, R. A. PIERCE, S. D. SHAPIRO. Matrix metalloproteinases generate angiostatin: effects on neovascularization. *J Immunol*, v.161, n.12, Dec 15, p.6845-52. 1998.

CORNELIUS, L. A., L. C. NEHRING, J. D. ROBY, W. C. PARKS, H. G. WELGUS. Human dermal microvascular endothelial cells produce matrix metalloproteinases in response to angiogenic factors and migration. *J Invest Dermatol*, v.105, n.2, Aug, p.170-6. 1995.

CRUM, R., S. SZABO, J. FOLKMAN. A New Class of Steroids Inhibits Angiogenesis in the Presence of Heparin or a Heparin Fragment. *Science*, v.230, n.4732, p.1375-1378. 1985.

D'AMORE, P. A., R. W. THOMPSON. Mechanisms of angiogenesis. *Annu Rev Physiol*, v.49, p.453-64. 1987.

DAVIS, R. H. **Aloe vera - a scientific approach**. New York:.. 1997

DHOOT, G. K., M. K. GUSTAFSSON, X. AI, W. SUN, D. M. STANDIFORD, C. P. EMERSON, JR. Regulation of Wnt signaling and embryo patterning by an extracellular sulfatase. *Science*, v.293, n.5535, Aug 31, p.1663-6. 2001.

DIAS, P. F., J. M. SIQUEIRA-JUNIOR, L. F. VENDRUSCO, T. J. NEIVA, M. MARASCHIN, A. GAGLIARDI, R. M. RIBEIRO-DO-VALLE. Antiangiogenic and antitumoral properties of polysaccharide isolated from the seaweed *Sargassum stenophyllum*. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2005.

DORDUNOO, S. K., J. K. JACKSON, L. A. ARSENAULT, A. M. OKTABA, W. L. HUNTER, H. M. BURT. Taxol encapsulation in poly(epsilon-caprolactone) microspheres. *Cancer Chemother Pharmacol*, v.36, n.4, p.279-82. 1995.

DVORAK, H. F. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med*, v.315, n.26, Dec 25, p.1650-9. 1986.

EYAL-GILADI, H. The early embryonic development of the chick, as an epigenetic process. *Critical Rev Poultry Biol*, v.3, p.143-166. 1991.

FACHINGER, G., U. DEUTSCH, W. RISAU. Functional interaction of vascular endothelial-protein-tyrosine phosphatase with the Angiopoietin receptor Tie-2. *Oncogene*, v.18, n.43, Oct 21, p.5948-5953. 1999.

FALKENBERG, M. B., R. I. SANTOS, C. M. O. SIMÕES. Introdução a análise fitoquímica. farmacognosia da planta ao medicamento. Florianópolis, 2004. p.

FARNSWORTH, N. R., B. N. THAI. **Aloe vera, Aloe barbadensis**. 1992. 35-43 p. (Medicinal Plants)

FERRIER, C. M., G. N. P. VAN MUIJEN, D. J. RUITER. Proteases in cutaneous melanoma. *Annals of Medicine*, v.30, n.5, Oct, p.431-442. 1998.

FIDLER, I. J. Immune-Stimulation and/or Inhibition of Tumor-Cells Growth in-Vitro. *Federation Proceedings*, v.32, n.Mar, p.859-&. 1973.

FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*, v.285, n.21, Nov 18, p.1182-6. 1971.

_____. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med*, v.1, n.1, Jan, p.27-31. 1995.

- FOLKMAN, J., M. KLAGSBRUN. Angiogenic Factors. *Science*, v.235, n.4787, Jan 23, p.442-447. 1987.
- FOLKMAN, J., Y. SHING. Control of angiogenesis by heparin and other sulfated polysaccharides. *Adv Exp Med Biol*, v.313, p.355-64. 1992.
- GAGLIARDI, A., D. C. COLLINS. Inhibition of Angiogenesis by Antiestrogens. *Cancer Research*, v.53, n.3, Feb 1, p.533-535. 1993.
- GAGLIARDI, A., P. NICKEL, D. C. COLLINS. Derivatives of Suramin Inhibit Angiogenesis. *Faseb Journal*, v.7, n.3, Feb 19, p.A125-a125. 1993.
- GILBERT, M. M., J. SMITH, A. J. ROSKAMS, V. J. AULD. Neuroligin 3 is expressed in a wide range of glia during development. *Developmental Biology*, v.222, n.1, Jun 1, p.256-256. 2000.
- GRAHAM, J. G., M. L. QUINN, D. S. FABRICANT, N. R. FARNSWORTH. Plants used against cancer - an extension of the work of Jonathan Hartwell. *Journal of Ethnopharmacology*, v.73, n.3, Dec, p.347-377. 2000.
- GREENWALD, R. A., L. M. GOLUB, N. S. RAMAMURTHY, M. CHOWDHURY, S. A. MOAK, T. SORSA. In vitro sensitivity of the three mammalian collagenases to tetracycline inhibition: relationship to bone and cartilage degradation. *Bone*, v.22, n.1, Jan, p.33-8. 1998.
- GRINDLAY, D., T. REYNOLDS. The Aloe-Vera Phenomenon - a Review of the Properties and Modern Uses of the Leaf Parenchyma Gel. *Journal of Ethnopharmacology*, v.16, n.2-3, Jun, p.117-151. 1986.
- HALLIDAY, A. W., M. SCHACHTER, L. POSTON, B. J. HUNT. **An Introduction to Vascular Biology: From Basic Science to Clinical Practice**. Cambridge: Cambridge University Press, v.1. 2002 (0521796520)
- HAMBURGER, V., H. HAMILTON. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol*, v.88, p.49-92. 1951.
- HANAHAH, D., J. FOLKMAN. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, v.86, n.3, Aug 9, p.353-364. 1996.
- HAYNES, W. G. The treatment of acute head injuries. *J Med Assoc State Ala*, v.30, Aug, p.64-70. 1960.
- HENDRIX, M. J., E. A. SEFTOR, A. R. HESS, R. E. SEFTOR. Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma. *Nat Rev Cancer*, v.3, n.6, Jun, p.411-21. 2003.
- HIDALGO, M., S. G. ECKHARDT. Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. *J Natl Cancer Inst*, v.93, n.3, Feb 7, p.178-93. 2001.
- HORWITZ, A. F. Integrins and health. *Sci Am*, v.276, n.5, May, p.68-75. 1997.

HOUILLON, C. Tolerance of ovarian grafts between the various species of urodele Amphibia; effects on the emission of heterologous eggs. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D*, v.274, n.20, May 15, p.2790-3. 1972.

HSU, S. L., S. C. YIN, M. C. LIU, U. REICHERT, W. L. HO. Involvement of cyclin-dependent kinase activities in CD437-induced apoptosis. *Exp Cell Res*, v.252, n.2, Nov 1, p.332-41. 1999.

INGBER, D., T. FUJITA, S. KISHIMOTO, K. SUDO, T. KANAMARU, H. BREM, J. FOLKMAN. Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumour growth. *Nature*, v.348, n.6301, Dec 6, p.555-7. 1990.

IRUELA-ARISPE, M. L., T. F. LANE, D. REDMOND, M. REILLY, R. P. BOLENDER, T. J. KAVANAGH, E. H. SAGE. Expression of SPARC during development of the chicken chorioallantoic membrane: evidence for regulated proteolysis in vivo. *Mol Biol Cell*, v.6, n.3, Mar, p.327-43. 1995.

JAKOB, W., K. D. JENTZSCH, B. MAUERSBERGER, G. HEDER. Chick-Embryo Chorioallantoic Membrane as a Bioassay for Angiogenesis Factors - Reactions Induced by Carrier Materials. *Experimentelle Pathologie*, v.15, n.5, p.241-249. 1978.

JONES, N., K. ILJIN, D. J. DUMONT, K. ALITALO. Tie receptors: New modulators of angiogenic and lymphangiogenic responses. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v.2, n.4, Apr, p.257-267. 2001.

KAMETANI, S., A. KOJIMA-YUASA, H. KIKUZAKI, D. O. KENNEDY, M. HONZAWA, I. MATSUI-YUASA. Chemical constituents of cape aloe and their synergistic growth-inhibiting effect on Ehrlich ascites tumor cells. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, v.71, n.5, May, p.1220-1229. 2007.

KANDEL, J., E. BOSSY-WETZEL, F. RADVANYI, M. KLAGSBRUN, J. FOLKMAN, D. HANAHAN. Neovascularization is associated with a switch to the export of bFGF in the multistep development of fibrosarcoma. *Cell*, v.66, n.6, Sep 20, p.1095-104. 1991.

KAWAI, K., H. BEPPU, T. KOIKE, K. FUJITA, T. MARUNOUCHI. Tissue-Culture of Aloe-Arborescens Miller Var Natalensis Berger. *Phytotherapy Research*, v.7, Spr, p.S5-S10. 1993.

KOCH, A. Metabolism of aloin--the influence of nutrition. *J Pharm Biomed Anal*, v.14, n.8-10, Jun, p.1335-8. 1996.

KOCH, A. E. Angiogenesis - Implications for rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, v.41, n.6, Jun, p.951-962. 1998.

KRUGER, A., R. SOELTL, I. SOPOV, C. KOPITZ, M. ARLT, V. MAGDOLEN, N. HARBECK, B. GANSBACHER, M. SCHMITT. Hydroxamate-type matrix metalloproteinase inhibitor batimastat promotes liver metastasis. *Cancer Res*, v.61, n.4, Feb 15, p.1272-5. 2001.

- KUO, P. L., T. C. LIN, C. C. LIN. The antiproliferative activity of aloe-emodin is through p53-dependent and p21-dependent apoptotic pathway in human hepatoma cell lines. *Life Sciences*, v.71, n.16, Sep 6, p.1879-1892. 2002.
- LEE, H. Z., S. L. HSU, M. C. LIU, C. H. WU. Effects and mechanisms of aloe-emodin on cell death in human lung squamous cell carcinoma. *Eur J Pharmacol*, v.431, n.3, Nov 23, p.287-95. 2001.
- LEUNG, A. Y. Aloe - Vera in Cosmetics. *Drug & Cosmetic Industry*, v.120, n.6, p.34-&. 1977.
- LOCKSHIN, R. A., Z. ZAKERI. Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v.2, n.7, Jul, p.545-50. 2001.
- LULINSKI, S., J. SERWATOWSKI. Bromine as the ortho-directing group in the aromatic metalation/silylation of substituted bromobenzenes. *Journal of Organic Chemistry*, v.68, n.24, Nov 28, p.9384-9388. 2003.
- MAPP, R. K., T. J. MCCARTHY. Assessment of Purgative Principles in Aloes. *Planta Medica*, v.18, n.4, p.361-&. 1970.
- MCCORMICK, J. F., J. NASSAUER, J. BIELUNAS, J. LEIGHTON. Anatomy of the Chick Chorioallantoic Membrane Relevant to Its Use as a Substrate in Bioassay Systems. *Scanning Electron Microscopy*, p.2023-2030. 1984.
- MOON, E. J., Y. M. LEE, O. H. LEE, M. J. LEE, S. K. LEE, M. H. CHUNG, Y. I. PARK, C. K. SUNG, J. S. CHOI, K. W. KIM. A novel angiogenic factor derived from Aloe vera gel: beta-sitosterol, a plant sterol. *Angiogenesis*, v.3, n.2, p.117-23. 1999.
- MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival - Application to Proliferation and Cyto-Toxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*, v.65, n.1-2, p.55-63. 1983.
- MOURY, J. D., G. C. SCHOENWOLF. Cooperative model of epithelial shaping and bending during avian neurulation: autonomous movements of the neural plate, autonomous movements of the epidermis, and interactions in the neural plate/epidermis transition zone. *Dev Dyn*, v.204, n.3, Nov, p.323-37. 1995.
- MUNDHENKE, C., K. MEYER, S. DREW, A. FRIEDL. Heparan sulfate proteoglycans as regulators of fibroblast growth factor-2 receptor binding in breast carcinomas. *Am J Pathol*, v.160, n.1, Jan, p.185-94. 2002.
- NGUYEN, M., Y. SHING, J. FOLKMAN. Quantitation of Angiogenesis and Antiangiogenesis in the Chick-Embryo Chorioallantoic Membrane. *Microvascular Research*, v.47, n.1, Jan, p.31-40. 1994.
- NOWELL, P. C. Mechanisms of tumor progression. *Cancer Res*, v.46, n.5, May, p.2203-7. 1986.

ODES, H. S., Z. MADAR. A double-blind trial of a celandin, aloevera and psyllium laxative preparation in adult patients with constipation. *Digestion*, v.49, n.2, p.65-71. 1991.

OKAMURA, N., N. HINE, S. HARADA, T. FUJIOKA, K. MIHASHI, A. YAGI. Three chromone components from Aloe vera leaves. *Phytochemistry*, v.43, n.2, p.495-498. 1996.

OPPENHEIM, R. W., H. L. LEVIN, M. S. HARTH. An investigation of various egg-opening techniques for use in avian behavioral embryology. *Dev Psychobiol*, v.6, n.1, Jan, p.53-68. 1973.

PALSSON, B. O., S. N. BHATIA. **Tissue Engineering**. New Jersey: Pearson Prentice Hall. 2004. 432 p.

PECERE, T., M. V. GAZZOLA, C. MUCIGNAT, C. PAROLIN, F. DALLA VECCHIA, A. CAVAGGIONI, G. BASSO, A. DIASPRO, B. SALVATO, M. CARLI, G. PALU. Aloe-emodin is a new type of anticancer agent with selective activity against neuroectodermal tumors. *Cancer Research*, v.60, n.11, Jun 1, p.2800-2804. 2000.

PEEK, M. J., T. M. NORMAN, C. MORGAN, R. MARKHAM, I. S. FRASER. The Chick Chorioallantoic Membrane Assay - an Improved Technique for the Study of Angiogenic Activity. *Experimental Pathology*, v.34, n.1, p.35-40. 1988.

PRINCIVALLE, M., A. DE AGOSTINI. Developmental roles of heparan sulfate proteoglycans: a comparative review in Drosophila, mouse and human. *Int J Dev Biol*, v.46, n.3, May, p.267-78. 2002.

REDDY, K. B., S. M. NABHA, N. ATANASKOVA. Role of MAP kinase in tumor progression and invasion. *Cancer and Metastasis Reviews*, v.22, n.4, Dec, p.395-403. 2003.

REYNOLDS, T., A. C. DWECK. Aloe vera leaf gel: a review update. *Journal of Ethnopharmacology*, v.68, n.1-3, Dec 15, p.3-37. 1999.

RISAU, W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, v.386, n.6626, Apr 17, p.671-674. 1997.

RISAU, W., H. SARIOLA, H. G. ZERWES, J. SASSE, P. EKBLÖM, R. KEMLER, T. DOETSCHMAN. Vasculogenesis and Angiogenesis in Embryonic-Stem-Cell-Derived Embryoid Bodies. *Development*, v.102, n.3, Mar, p.471-478. 1988.

SA-ROCHA, V. M., L. C. SA-ROCHA, J. PALERMO-NETO. Variations in behavior, innate immunity and host resistance to B16F10 melanoma growth in mice that present social stable hierarchical ranks. *Physiology & Behavior*, v.88, n.1-2, Jun 15, p.108-115. 2006.

SCHOENWOLF, G. C. Formation and patterning of the avian neuraxis: one dozen hypotheses. *Ciba Found Symp*, v.181, p.25-38; discussion 38-50. 1994.

SCHULZE-OSTHOFF, K., H. WALCZAK, W. DROGE, P. H. KRAMMER. Cell nucleus and DNA fragmentation are not required for apoptosis. *J Cell Biol*, v.127, n.1, Oct, p.15-20. 1994.

SCOZZAFAVA, A., M. A. ILIES, G. MANOLE, C. T. SUPURAN. Protease inhibitors. Part 12. Synthesis of potent matrix metalloproteinase and bacterial collagenase inhibitors incorporating sulfonylated N-4-nitrobenzyl-beta-alanine hydroxamate moieties. *Eur J Pharm Sci*, v.11, n.1, Jul, p.69-79. 2000.

SCOZZAFAVA, A., C. T. SUPURAN. Carbonic anhydrase and matrix metalloproteinase inhibitors: sulfonylated amino acid hydroxamates with MMP inhibitory properties act as efficient inhibitors of CA isozymes I, II, and IV, and N-hydroxysulfonamides inhibit both these zinc enzymes. *J Med Chem*, v.43, n.20, Oct 5, p.3677-87. 2000a.

_____. Protease inhibitors: synthesis of potent bacterial collagenase and matrix metalloproteinase inhibitors incorporating N-4-nitrobenzylsulfonylglycine hydroxamate moieties. *J Med Chem*, v.43, n.9, May 4, p.1858-65. 2000b.

SHIBLEY, I. A., JR., S. N. PENNINGTON. Sodium ion-dependent (N-methylamino)-alpha-isobutyric [correction of isobutyric] acid uptake by embryonic chick cells exposed to ethanol in ovo: response to the stimulation/downregulation of protein kinases. *Alcohol*, v.33, n.5, Sep-Oct, p.451-6. 1998.

SHINOURA, N., Y. YOSHIDA, M. NISHIMURA, Y. MURAMATSU, A. ASAI, T. KIRINO, H. HAMADA. Expression level of Bcl-2 determines anti- or proapoptotic function. *Cancer Res*, v.59, n.16, Aug 15, p.4119-28. 1999.

SMITH, G. N., JR., E. A. MICKLER, K. A. HASTY, K. D. BRANDT. Specificity of inhibition of matrix metalloproteinase activity by doxycycline: relationship to structure of the enzyme. *Arthritis Rheum*, v.42, n.6, Jun, p.1140-6. 1999.

SNEDDON, H., R. HADDEN, P. G. HEPPEL. Chemosensory learning in the chicken embryo. *Physiol Behav*, v.64, n.2, May, p.133-9. 1998.

SOEDA, S., S. SAKAGUCHI, H. SHIMENO, A. NAGAMATSU. Fibrinolytic and anticoagulant activities of highly sulfated fucoidan. *Biochem Pharmacol*, v.43, n.8, Apr 15, p.1853-8. 1992.

SOEDA, S., Y. SHIBATA, H. SHIMENO. Inhibitory effect of oversulfated fucoidan on tube formation by human vascular endothelial cells. *Biol Pharm Bull*, v.20, n.11, Nov, p.1131-5. 1997.

SWEENEY, M., D. BEDDY, V. HONNER, B. SINNOTT, R. G. O'REGAN, P. MCLOUGHLIN. Effects of changes in pH and CO₂ on pulmonary arterial wall tension are not endothelium dependent. *Journal of Applied Physiology*, v.85, n.6, Dec, p.2040-2046. 1998.

SYDISKIS, R. J., D. G. OWEN, J. L. LOHR, K. H. ROSLER, R. N. BLOMSTER. Inactivation of enveloped viruses by anthraquinones extracted from plants. *Antimicrob Agents Chemother*, v.35, n.12, Dec, p.2463-6. 1991.

TIAN, B., Y. J. HUA. Concentration-dependence of prooxidant and antioxidant effects of aloin and aloe-emodin on DNA. *Food Chemistry*, v.91, n.3, Jul, p.413-418. 2005.

- TOBELEM, G. Tumor Angiogenesis. *M S-Medecine Sciences*, v.6, n.5, May, p.426-432. 1990.
- TURNER, C. E., D. A. WILLIAMSON, P. A. STROUD, D. J. TALLEY. Evaluation and comparison of commercially available Aloe vera L. products using size exclusion chromatography with refractive index and multi-angle laser light scattering detection. *International Immunopharmacology*, v.4, n.14, Dec 20, p.1727-1737. 2004.
- TYLER, V. E. A history of pharmacy: future opportunities. *Pharm Hist*, v.35, n.4, p.163-8. 1993.
- VALDES-DAPENA, M. A., J. B. AREY. The diagnosis of malignant neoplasms in infants and children. *Ann Clin Lab Sci*, v.4, n.3, May-Jun, p.164-73. 1974.
- VU, M. T., C. F. SMITH, P. C. BURGER, G. K. KLINTWORTH. Methods in Laboratory Investigation - an Evaluation of Methods to Quantitate the Chick Chorioallantoic Membrane Assay in Angiogenesis. *Laboratory Investigation*, v.53, n.4, p.499-508. 1985.
- WAGENER, C., S. ERGUN. Angiogenic properties of the carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1. *Exp Cell Res*, v.261, n.1, Nov 25, p.19-24. 2000.
- YANCOPOULOS, G. D., S. DAVIS, N. W. GALE, J. S. RUDGE, S. J. WIEGAND, J. HOLASH. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*, v.407, n.6801, Sep 14, p.242-8. 2000a.
- _____. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*, v.407, n.6801, Sep 14, p.242-248. 2000b.
- ZONTA, F., P. BOGONI, P. MASOTTI, G. MICALI. High-performance liquid chromatographic profiles of aloe constituents and determination of aloin in beverages, with reference to the EEC regulation for flavouring substances. *J Chromatogr A*, v.718, n.1, Dec 1, p.99-106. 1995.
- ZUCKER, S., J. CAO, W. T. CHEN. Critical appraisal of the use of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer treatment. *Oncogene*, v.19, n.56, Dec 27, p.6642-50. 2000.

ANEXO

O modelo matemático proposto por Palsson & Bhatia (2004) para morte celular de uma população de células é representado pela equação 1:

$$\frac{dX}{dt} : -\alpha X \quad (1)$$

Onde:

X: população de células

α: velocidade específica de morte celular

t: tempo

A equação 2 proposta por Palsson e Bhatia (2004) representa a velocidade específica de morte celular causada pela variação na concentração de um efector (fármaco, substância, composto).

$$\alpha(C) : \frac{\alpha_{\text{máx}} \cdot C}{k_m + C} \quad (2)$$

Onde:

K_m: O valor da concentração para a qual a população celular é destruída em 50%.

A equação 3 representa o comportamento das células de melanoma (linhagem B16F10) na presença de aloína e EPC como agentes efetores de morte celular.

$$\frac{dy}{dX} : \frac{-1}{aX + b} \quad (3)$$

Onde:

y: população de células

X: concentração relativa (*C/C₀*)

Rearranjando o modelo de morte celular proposto nas equações 1 e 2

$$\frac{dX}{dt} : \frac{dX}{dC} \cdot \frac{dC}{dt}$$

$$\frac{dX}{dC} : \frac{dX}{dt} \cdot \frac{dt}{dC} \cong \frac{dX}{dt} \cdot \frac{\Delta t}{\Delta C}$$

$$\frac{dX}{dC} : -\alpha \cdot X \cdot \frac{\Delta t}{\Delta C}$$

$$\frac{dX}{dC} : \frac{-\alpha_{\text{máx}} \cdot C}{km + C} \cdot X \cdot \frac{\Delta t}{\Delta C} \left. \vphantom{\frac{dX}{dC}} \right\} \frac{\Delta t}{\Delta C} : \frac{48}{C - 0}$$

$$\frac{1}{dX} \cdot \frac{dX}{dC} : \frac{-\alpha_{\text{máx}} \cdot C \cdot \frac{\Delta t}{C}}{km + C}$$

$$\frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dC} : \frac{-\alpha_{\text{máx}}}{km + C} \quad (4)$$

Através da equação 1 percebemos que:

$$\frac{1}{dX} \cdot \frac{dX}{dt} : -\alpha \quad (5)$$

Sendo que $\frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dC}$ é proporcional à velocidade específica de morte celular. Como

mostrado abaixo:

$$\frac{dy}{dt} \propto \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt}$$

$$dy \propto \frac{1}{dX} \cdot \frac{dX}{dt} \cdot dt$$

$$dy : \frac{1}{X} \cdot dX$$

Logo a equação 4 pode ser escrita da seguinte forma:

$$\frac{dy}{dC} : \frac{-\alpha_{\text{máx}}}{km + C} \quad (6)$$

Desta forma relacionando-se a equação 3 com a equação 6 obtêm-se:

$$\frac{dy}{dX} : \frac{-1}{aX+b} \quad (3)$$

Onde

$$a : \frac{1}{\alpha_{máx}} \quad e \quad b : \frac{km}{\alpha_{máx}} \quad e \quad \frac{b}{a} : km$$

Integrando a equação 3:

$$dy : \frac{-dX}{aX+b}$$

$$\int_{y_0}^y dy : \frac{-1}{a} \int_{x_0}^x \frac{dX}{aX+b}$$

$$y : y_0 - \frac{1}{a} [\ln(aX+b) - \ln(aX_0+b)]$$

$$y : y_0 - \frac{1}{a} \left[\ln \left(\frac{aX+b}{aX_0+b} \right) \right]$$

Assumindo que:

$$b : \frac{k_\delta}{\delta_{máx}}$$

$$\frac{b}{a} : -k_\delta$$

$$a : -\frac{1}{\delta_{máx}}$$

Substituindo

$$dy:dX \quad e \quad dX:dC$$

O modelo proposto pode ser escrito da seguinte forma:

$$\frac{dX}{dC} : \frac{-\delta_{m\acute{a}x}}{k_{\delta} - C} \quad (8)$$

Integrando-se a equação 8 e substituindo as cosideraoes, obtemos o modelo matemático que representa a morte das células de melanoma (linhagem B16F10), tratadas com diferentes doses de aloina e EPC provenientes da *Aloe vera*:

$$X : 1 - \delta_{m\acute{a}x} \cdot \ln\left(\frac{C}{k_{\delta}} - 1\right) \quad (9)$$