

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – CAMPUS BOTUCATU

“Avaliação dos efeitos de aloe-emodin em células uroteliais
imortalizadas e neoplásicas cultivadas *in vitro*”

Marina Araújo Naves

Acadêmica

Prof. Dr. Deilson Elgui de Oliveira

Orientador

Dra. Mitscheli Sanches da Rocha

Prof. Dr. João Lauro Viana de Camargo

Co-orientadores

Botucatu, SP

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – CAMPUS BOTUCATU

“Avaliação dos efeitos de aloe-emodin em células uroteliais
imortalizadas e neoplásicas cultivadas *in vitro*”

Marina Araújo Naves

Acadêmica

Prof. Dr. Deilson Elgui de Oliveira

Orientador

Prof. Dr. João Lauro Viana de Camargo

Dra. Mitscheli Sanches da Rocha

Co-orientadores

Monografia desenvolvida em nível
de Iniciação Científica no
Departamento de Patologia da
Faculdade de Medicina de
Botucatu – UNESP para obtenção
do título de Biomédica.

Botucatu, SP

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Naves, Marina.

Avaliação dos efeitos de aloe-emodin em células uroteliais imortalizadas e neoplásicas cultivadas in vitro / Marina Naves. - Botucatu, 2013

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) -
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Deilson Elgui de Oliveira

Coorientador: João Lauro Viana de Camargo

Coorientador: Mitscheli Sanches da Rocha

Capes: 40105008

1. Babosa (Planta) - Uso terapêutico. 2. Carcinogênese. 3. Células - Cultura e meios de cultura. 4. Bexiga - Câncer.

Palavras-chave: Aloe vera; Aloe-emodin; Carcinogênese; Ensaio in vitro; Toxicopatologia.

Dedicatória

Dedico este trabalho a minha família, aos meus pais, Sandra e Romilton e aos meus irmãos, Vinicius e Isadora, pelo amor incondicional que me motiva todos os dias. Pelo apoio e orientação nas minhas decisões, o que fez com que eu me tornasse uma pessoa melhor a cada dia, mostrando que com carinho e dedicação podemos ser e realizar tudo que sonhamos.

Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer à minha orientadora, Dra. Mitscheli Sanches da Rocha, por acreditar em minha capacidade, pelos ensinamentos que me fizeram crescer durante este trabalho, pela paciência e horas de dedicação, pela segurança proporcionada, e pela oportunidade de compartilhar conhecimentos que permitiram com que todas as etapas deste trabalho fossem concluídas com êxito e que, com certeza, serão importantes para meu futuro profissional.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Deilson Elgui de Oliveira e ao Prof. Dr. João Lauro Viana de Camargo por me aceitarem de braços abertos em seus laboratórios e grupos de pesquisa, permitindo minha participação nas atividades acadêmicas realizadas e todo meu aprendizado. Agradeço pela oportunidade concedida, que aumentou meus conhecimentos e a minha segurança para construir uma carreira.

Agradeço imensamente aos meus pais, Romilton e Sandra, pelo esforço e dedicação que me permitiram permanecer estudando em outra cidade, e lidar com o que gosto todos os dias. Pelo suporte emocional, conselhos e apoio em todas as minhas decisões, fazendo com que eu pudesse seguir em frente com sabedoria e paciência, e nunca desistir dos meus sonhos.

Agradeço aos meus irmãos, Vinicius e Isadora, por todas as brincadeiras e companheirismo do dia-a-dia. Por serem meu porto-seguro e os melhores amigos para uma vida inteira. Pela alegria que é minha motivação todos os dias.

Agradeço ao Lucas, pelo amor que me tranquiliza. Por estar ao meu lado nas horas mais difíceis e nas alegrias também. Pela segurança que me proporciona em todos os momentos. Pelo companheirismo em todos estes anos e confiança depositada em mim que me permitem seguir em frente.

Gostaria de agradecer também às minhas amigas e companheiras de laboratório, a Annie, Nathália e Ana Paula, das quais vou sentir muita saudade. Por compartilharem comigo seus conhecimentos e terem calma para me

ensinar, permitindo com que este trabalho fosse realizado. Pelas risadas do dia-a-dia de trabalho, tornando tudo mais divertido e prazeroso.

Agradeço eternamente às amigas que fiz ao longo destes quatro anos de faculdade, à Camila (Trolha), à Larissa (Lecê), à Thaís (Garga), à Bárbara (Wendy), à Jussara (Godira) e Erica (Tosa), pelas risadas, pelas fofocas, pelas brincadeiras, por cada saída, pela companhia, por me animarem e me motivarem nesta jornada. Sem vocês, a faculdade não teria a menor graça. Vou sentir muita saudade de ter vocês comigo todos os dias.

Agradeço também à Shiva, Luna, Kinder, Nina, Bebê e Mel, que com um amor incondicional e inocente, proporcionaram boas risadas e uma companhia fiel ao longo destes anos que nunca vou esquecer.

Sumário

1. Abstract	12
2. Resumo	14
3. Introdução	17
3.1 O Câncer de Bexiga.....	17
3.2 Uso de plantas no tratamento de neoplasias e outras doenças	20
3.3. Uso de ensaios in vitro na pesquisa em câncer de bexiga.....	25
3.4. Importância da Aloe vera em uso para tratamentos terapêuticos	27
3.5. O Aloe-emodin como uma droga antitumoral em potencial	31
4. Objetivos	40
4.1 Objetivo Geral.....	40
4.2 Objetivos Específicos	40
5. Material e Métodos	42
5.1 Material teste	42
5.2 Linhagens celulares e padronização do cultivo in vitro	42
5.3 Determinação da concentração de células para experimentação	44
5.4 Preparo da solução de aloe-emodin.....	44
5.5. Avaliação da citotoxicidade do aloe-emodin	45
6. Resultados	48
6.1 Concentração ideal de células a serem semeadas para cada linhagem	48
6.2 Avaliação da exposição in vitro ao aloe-emodin	48
7. Discussão	52
8. Referências Bibliográficas	57

Índice de Figuras e Tabelas

Figura 1 - Aspecto das linhagens celulares utilizadas no estudo avaliadas em microscopia óptica convencional. Todas em aumento de 200x.	43
Figura 2 – Testes de citotoxicidade realizados com as linhagens uroteliais T24, 5637 e RT4. Média obtida de 3 experimentos.....	48
Figura 3 – Experimentos para obtenção de IC50 na linhagem RT4, utilizando concentrações até 200 μ M.	49
Tabela 1 – IC50 obtida a partir da média de três experimentos independentes de viabilidade celular realizados com as três diferentes linhagens. O valor de R ² apresentado indica confiabilidade da amostra em relação à estatística utilizada (regressão não-linear).	49
Tabela 2 – Valores de IC50 obtidos para cada experimento feito com a linhagem RT4 e média dos três experimentos independentes, utilizando até a concentração de 200 μ M de aloe-emodin. Adicionalmente, é apresentado o valor de R ² , o qual indica confiabilidade da amostra em relação à estatística utilizada (regressão não-linear).	49

Abstract

1. Abstract

Aloe vera (*Aloe barbadensis Miller*), popularly known in Brazil as “babosa”, has a long history of use as medicinal plant for different therapeutic purposes. The components of the plant extract are present in various products of human use, mainly for nutritional and cosmetics purposes. However, some studies suggest that this extract might also have carcinogenic activity. The aloe vera extract is a complex mixture of bioactive compounds. The study of isolated compounds may contribute to elucidate contradictory results about the effects related to the consumption of the plant, as well as their mechanisms of action. One of the most important compound from Aloe vera is aloe-emodin, which is a secondary metabolite generated in the intestinal tract. Putative antimicrobial and antitumor effects were previously attributed to aloe-emodin. Although the exposure of urothelial cells to aloe-emodin was already reported in the literature, only one study showed its effects on urothelial cells, suggesting that aloe-emodin inhibits the viability of T24 cancer cells due to apoptosis induction. Since there is no sufficient information about the effects of aloe-emodin on urothelial cells, and low efficiency in the treatment of bladder cancer currently, the present study aims to evaluate the hypothesis that the treatment with aloe-emodin could impact the behavior of other urothelial cell lines *in vitro*. Therefore, the *in vitro* IC₅₀ exposure of aloe-emodin to human immortalized neoplastic urothelial cells will be determined in order to verify possible differences in the behavior of urothelial cells *in vitro* treated with aloe-emodin in comparison with untreated cells. Furthermore, differences between cell lines will be also evaluated.

Resumo

2. Resumo

A aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller), popularmente conhecida como “babosa”, tem um longo histórico de uso como planta medicinal para diversos fins terapêuticos. Componentes do extrato da planta estão presentes em diversos produtos para consumo humano, principalmente nutricionais e da área cosmética. Entretanto, alguns estudos sugerem que o extrato dessa planta possui também atividade cancerígena. O extrato da aloe vera é uma mistura complexa de compostos bioativos. O estudo de seus compostos isolados pode auxiliar na elucidação de resultados contraditórios em relação aos efeitos decorrentes do consumo da planta, bem como seus mecanismos de ação. Dentre esses compostos destaca-se o aloe-emodin, metabólito secundário formado no trato intestinal e que tem sido relacionado com as supostas propriedades antimicrobianas e antitumorais atribuídas ao consumo da planta. Ainda que a exposição de células uroteliais ao aloe-emodin já tenha sido proposta na literatura, apenas um estudo identificado avaliou seus efeitos em células uroteliais, sugerindo que o aloe-emodin inibe a viabilidade de células neoplásicas T24 ao induzir sua apoptose. Tendo em vista a escassez de informações sobre os efeitos do aloe-emodin em células uroteliais, e a dificuldade encontrada para tratamento do câncer de bexiga, o presente estudo visa avaliar a hipótese de que o tratamento com aloe-emodin modifica o comportamento de outras linhagens de células uroteliais cultivadas *in vitro*. Para tanto será determinado a IC50 de exposição *in vitro* de aloe-emodin para linhagem de células uroteliais humanas neoplásicas imortalizadas de modo a se verificar eventuais diferenças no comportamento *in vitro* de células uroteliais

tratadas com aloe-emodin em relação às células não tratadas, bem como diferenças entre as linhagens estudadas.

Introdução

3. Introdução

3.1 O Câncer de Bexiga

A partir dos anos 1960 tem se observado mudanças no perfil das enfermidades que acometem populações humanas. Doenças infecciosas e parasitárias deixaram de ser a principal causa de morte, sendo substituídas pelas doenças do aparelho circulatório e pelas neoplasias. A progressiva ascensão da incidência e da mortalidade por doenças crônico-degenerativas tem como principal fator o envelhecimento da população, resultado do intenso processo de urbanização e das ações de promoção e recuperação da saúde¹. Nesse cenário, os cânceres têm se tornado um problema de saúde pública cada vez mais relevante, em particular nas últimas décadas.

O câncer de bexiga ocupa a quarta posição no ocidente dentre as neoplasias malignas mais comuns. Nos EUA e na Europa, representa 5-10% de todas as neoplasias que afetam os homens. Independentemente da etnia, os homens tem de 3 a 4 vezes mais riscos de desenvolver essa câncer de bexiga em relação às mulheres, sendo que a maior parte dos casos é diagnosticada a partir dos 65 anos de idade. Por outro lado, indivíduos negros são menos propensos a desenvolver câncer de bexiga do que os caucasianos, por razões desconhecidas². No Brasil, esse tipo de câncer ocupa a 7^a e 10^a posição de incidência em homens e mulheres, respectivamente³.

Estruturalmente, a bexiga de mamíferos se caracteriza por ser um órgão oco, cuja parede é constituída das camadas serosa, muscular, submucosa, mucosa muscular e lâmina própria, tendo a superfície interna recoberta por

uma camada de células epiteliais transicionais de origem endodermal⁴. Essa camada interna de células está altamente sujeita à ação de substâncias presentes na urina, cancerígenas ou não. Em virtude da ação potencial de substâncias com ação cancerígena, é de se esperar que as células do revestimento urotelial possam eventualmente originar tumores. Cerca de 90% dos cânceres na bexiga são carcinomas de células transicionais, com os 10% restantes compreendendo carcinomas de células escamosas, adenocarcinomas, carcinomas de pequenas células e, mais raramente, tumores derivados do mesênquima⁵.

A recorrência tumoral é um fenômeno frequente para o carcinoma urotelial de bexiga. Aproximadamente 70% dos pacientes com tumores superficiais têm recorrências, sendo que 10% a 20% progridem para invasão muscular⁶. Sabe-se que o comportamento clínico do carcinoma de células transicionais está relacionado ao acúmulo de alterações genéticas nas células transformadas⁷. Análises genéticas têm mostrado que alterações nos protooncogenes RAS (*RAS p21 protein activator - GTPase activating protein - 1 - RASA1*) e erb-B2 (*v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2 - ERBB2*), o gene supressor tumoral TP53 (*Tumor protein p53 - TP53*) e receptor de fator de crescimento epidermal (*epidermal growth factor receptor - EGFR*) são os mais importantes marcadores prognósticos para o câncer de bexiga⁸. Adicionalmente, carcinomas de células transicionais de baixo e alto grau se distinguem geneticamente, dentre outras características, pela perda de 9q e alterações no cromossomo 17 (onde se localiza *TP53*), respectivamente⁹.

Desde 1954 o câncer de bexiga tem sido relacionado à exposição ocupacional, o que pode ser notado pela relação entre a exposição a aminas aromáticas e o aumento da frequência desse câncer em trabalhadores das indústrias de tinta, têxtil e de borracha¹⁰. Acredita-se que os metabólitos formados a partir da biotransformação destas aminas no fígado são excretados na urina, deixando um ambiente mais ácido na bexiga. Esse excesso de acidez, em conjunto com os metabólitos, leva a formação de grande quantidade de um íon aril nitrênio, altamente reativo e mutagênico; este, em contato com a parede epitelial, ocasiona elevação da proliferação celular, de modo a atuar tanto como agente iniciador como promotor. Como as aminas aromáticas podem ser inativadas por acetilação, indivíduos com perfil metabólico de mau acetiladores são mais susceptíveis ao desenvolvimento de câncer de bexiga¹¹.

Uma variedade de agentes químicos, incluindo substâncias distribuídas no ambiente, têm sido associadas a aumento de risco para desenvolvimento do câncer de bexiga. Estima-se que 20-25% da população masculina nos EUA desenvolvem a doença como resultado de exposição ocupacional. Entretanto, o tabagismo é considerado o principal fator de risco para o desenvolvimento do câncer de bexiga, o que foi associado ao elevado nível de aminas aromáticas presentes no tabaco, principalmente a 4-aminobifenila¹².

O sintoma mais comum do câncer de bexiga é hematúria indolor, notada em 85% dos pacientes¹³. Atualmente, as melhores formas de diagnóstico disponíveis são a citologia urinária e procedimentos de imagens da bexiga¹⁴, como raio-X, tomografia e cistosopia.

Apesar dos avanços nas terapias para tratamento dos pacientes, as técnicas realmente efetivas continuam sendo as cirurgias endoscópicas para retirada do tumor¹⁵. Para evitar as recorrências dos carcinomas de células transicionais, o paciente pode ser submetido à quimioterapia, que inclui, normalmente, os compostos cisplatina e gencitabina¹⁶. A eficácia da quimioterapia pode ser ampliada com terapias complementares, como a administração conjunta de outras drogas e terapia intravesical. A mais terapia intravesical mais difundida é a inoculação do bacilo Calmette-Guérin (BCG), que promovem intensa resposta inflamatória local ao aderirem na parede da bexiga, favorecendo o ataque imunológico às células neoplásicas¹⁷.

A despeito dos tratamentos empregados, a taxa de sobrevivência dos pacientes em estágio avançado da doença é muito baixa. Adicionalmente, o longo período de acompanhamento para tratamento do câncer vesical torna o custo dessa doença um dos mais elevados em relação a outros tipos de cânceres¹⁸. A resistência a drogas antineoplásicas, seu efeito tóxico e a recorrência tumoral em curto prazo permanecem entre os maiores obstáculos no combate do câncer de bexiga¹⁹. Por essa razão, há grande necessidade de se estudar novas abordagens terapêuticas e tratamentos suplementares contra essa doença.

3.2 *Uso de plantas no tratamento de neoplasias e outras doenças*

As plantas têm sido utilizadas no tratamento de doenças ao longo da história. Há arquivos sumérios que relatam o uso de plantas com propriedades medicinais há 5.000 anos, e evidências arqueológicas sugerem que o uso é ainda mais remoto²⁰. Um marco importante do uso de

plantas na saúde humana foi a descoberta da aspirina em 1897, um sintético do ácido salicílico, composto ativo da casca do salgueiro. Desde então as plantas são intensamente estudadas na perspectiva de identificação de novos compostos com propriedades terapêuticas²¹. Aproximadamente 11% das 252 drogas consideradas básicas e essenciais pela Organização Mundial de Saúde (OMS) são de origem natural, evidenciando a contribuição das plantas no tratamento de doenças²².

Devido à diversidade de ecossistemas no Brasil, diversas espécies de plantas potencialmente medicinais podem ser encontradas no país. O uso popular de muitas dessas plantas para fins terapêuticos é parte da cultura do país. Dentre as plantas mais utilizadas na medicina tradicional brasileira está o alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), utilizado como relaxante muscular, para tratamentos de asma, problemas cardíacos, e como fortalecedor de memória. A arruda (*Ruta graveolens* L.) é utilizada para tratamento de dores de cólicas menstruais, dores de cabeça e de estômago, além de ser empregada com fins abortivos. Ao picão-preto (*Bidens pilosa* L.) são atribuídos efeitos anti-inflamatórios, anti-hiperglicêmicos, e cicatrizantes, e o boldo (*Plectranthus barbatus* Andr.) apresenta propriedades analgésicas e antidiarréicas.

Digno de nota, dentre as 25 plantas mais utilizadas no país estão duas espécies do gênero *Aloe*, popularmente conhecida como “babosa”: a *Aloe barbadensis* Miller e a *Aloe arborensis* Miller. Ambas se destacam pelos potenciais efeitos anti-inflamatórios, antimicrobianos e pró-cicatrizantes, de modo que são muito utilizadas na área cosmética e no tratamento de feridas e queimaduras²³.

Apesar de difundido o uso dessas plantas, notadamente na forma de consumo de chás e outros preparados para administração via oral (e.g., “garrafadas”), muitas das propriedades popularizadas não possuem comprovação científica. Adicionalmente, a ausência de estudos de toxicidade faz com que a alta exposição a esses compostos possa oferecer riscos à saúde. De fato, os efeitos adversos do uso dessas plantas são frequentemente desconhecidos da população e podem ser graves: o alecrim, por exemplo, pode causar irritações gastrointestinais, de pele e aborto quando administrado em altas doses²⁴.

Há um longo histórico do uso de plantas para o tratamento de cânceres, com mais de 3.000 espécies estudadas²⁵. Em 1960 o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (National Cancer Institute - NCI) iniciou um programa para avaliação de plantas com possível efeito terapêutico, com foco em espécies de regiões temperadas. Esse programa propiciou avaliação clínica e pré-clínica de compostos destas plantas, possibilitando a descoberta de novos princípios ativos com atividade citotóxica e antitumoral, potencialmente úteis para o tratamento de neoplasias malignas²⁶.

Os primeiros agentes antitumorais de origem natural a avançarem para o uso clínico foram a vinblastina e a vincristina, isoladas da *Catharanthus roseus* G. Don. Ambos se mostraram eficientes no tratamento de leucemia linfóide em ratos²⁷. Subsequentemente muitos outros compostos e seus derivados passaram a ser utilizados para melhorar a eficácia dos tratamentos quimioterápicos. A podofilotoxina, isolada das espécies pertencentes ao gênero *Podophyllum*, tem histórico no tratamento de

cânceres de pele e verrugas, como as causadas pelo HPV. Posteriormente os seus derivados sintéticos etoposide e o teniposide passaram também a serem empregados no tratamento de linfomas, cânceres testiculares e brônquicos²⁸.

Substâncias da classe dos taxanes foram mais recentemente adicionados à lista de agentes quimioterápicos derivados de plantas. O paclitaxol foi inicialmente isolado de espécies do gênero *Taxus* e apresenta muitos derivados, como o docetaxol. O primeiro é usado no tratamento de carcinomas de mama, ovário e de pulmão, além de ter se mostrado efetivo contra o sarcoma de Kaposi. O docetaxol, por sua vez, é usado contra carcinomas de mama e de pulmão²⁹. Outros agentes importantes são os derivados da camptotecina (isolada da *Camptotheca acuminata Decne*), como o tepotecano, usado no tratamento de carcinomas de ovário e de pulmão, e o irinotecano, usado para tratamento de câncer colorretal³⁰. Há ainda a homoharringtonina, isolada da *Cephalotaxus harringtonia*, e o eliptínio, derivado da elipticina, isolada de várias espécies da família *Apocynaceae*. A primeira é usada no tratamento de leucemias mieloides, enquanto o segundo é usado no câncer de mama³¹.

Enquanto esses compostos citados já são reconhecidos e empregados como drogas para tratamento oncológico, outros com propriedades antineoplásicas promissoras encontram-se em fase de estudos para tentar elucidação de seus efeitos e respectivos mecanismos de ação, de modo a se identificar as atividades que podem ser realmente atribuídas ao composto, sua eficácia e segurança para uso. Nesse sentido encontram-se ainda em estudo os ácidos triterpenoides, que apresentaram propriedades

antitumoral *in vivo* e *in vitro* contra diversos cânceres, como o de mama, de ovário, de pâncreas e leucemias³². Mais recentemente foi descoberto o β -lapacone, que também apresentou atividade contra várias linhagens celulares cancerígenas, incluindo cânceres de mama e próstata e leucemias. Esse composto em particular mostrou-se promissor por atuar em células malignas resistentes a múltiplas drogas, inibindo a fosfatase Cdc25 (*cell division cycle 25C – CDC25C*) e desfosforilando enzimas importantes na progressão do ciclo celular, impedindo a proliferação de células neoplásicas³³.

Assim, as plantas oferecem oportunidade para a descoberta de novas drogas que podem auxiliar no tratamento dos cânceres e outras doenças. Adicionalmente a busca pelos mecanismos de ação dos compostos de moléculas isoladas das plantas, podem contribuir com a identificação de novas proteínas e conseqüente desenvolvimento de agentes tumorais mais específicos e seletivos³⁴.

Geralmente são requeridos de 20 a 30 anos para uma droga ser desenvolvida e empregada clinicamente e um grande número de agentes são excluídos em virtude de eficácia insuficiente e/ou toxicidade inaceitável. Por outro lado, plantas com supostas propriedades medicinais frequentemente são a única alternativa disponível para algumas comunidades e grupos étnicos da população que carecem de acesso à informação e tratamentos médicos convencionais³⁵.

Por essa razão, é habitual a comercialização de plantas ditas medicinais em feiras livres e mercados populares por todo o país, além de seu cultivo em domicílios. Entretanto, o uso indevido dessas plantas ocasiona

exposição potencialmente perigosa à saúde dos indivíduos. Assim sendo, estudos sistemáticos sobre as propriedades das plantas utilizadas pela população são requeridos para se reconhecer os fitoterápicos seguros à população e, ao mesmo tempo, propiciar a identificação de novos compostos úteis para tratamento de doenças humanas, incluindo cânceres.

3.3. Uso de ensaios *in vitro* na pesquisa em câncer de bexiga

A elucidação dos componentes ativos presentes nas plantas, bem como seus mecanismos de ação, vem sendo um dos maiores desafios para as diferentes áreas da pesquisa. As plantas contêm inúmeros constituintes e seus extratos, quando testados, podem apresentar efeitos sinérgicos entre os diferentes princípios ativos devido a presença de compostos de classes ou estruturas diferentes contribuindo para a mesma atividade³⁶. No estudo da atividade biológica de extratos vegetais é importante a seleção de bioensaios para a detecção do efeito específico. Os sistemas de ensaio devem ser simples, sensíveis e reprodutíveis. Assim, os estudos *in vitro* tornam-se ferramentas fundamentais não apenas para o entendimento da gênese e desenvolvimento de diversas doenças, mas, também, para a observação dos efeitos primários de tratamento utilizando um composto específico³⁷.

Há poucos avanços recentes relacionados ao tratamento do câncer de bexiga, até agora, a cirurgia continua sendo o único método curativo para esta doença. Adicionalmente, quimioterapias baseadas na combinação de medicamentos com a cisplatina para os estágios mais avançados não são totalmente eficazes, oferecendo apenas um aumento da sobrevivência em até 5 anos. O câncer de bexiga mostra-se altamente resistente à

quimioterapias, assim, um aumento no entendimento da biologia molecular desta doença e identificação de novos alvos terapêuticos efetivos é essencial. Enquanto há vários compostos com uma atividade antitumoral promissora, deve-se tomar cautela em quais modelos escolher para testá-los e garantir que possuem relevância para tratamento da doença em humanos. Assim como em outras doenças, muito estudos ainda estão em andamento para tentar elucidar as vias moleculares importantes que levam à tumorigênese e progressão do câncer de bexiga³⁸. No entanto, estudos pré-clínicos completos são necessários para identificar novos alvos terapêuticos e permitir o desenvolvimento de agentes antitumorais adequados.

Um grande número de linhagens celulares estão disponíveis com diferentes alterações genéticas e morfológicas. A maioria dos estudos que utilizam linhagens celulares *in vitro* de carcinoma urotelial são conduzidos com seu crescimento em monocamadas apoiadas em um plástico para cultura estéril. No entanto, mesmo simples e econômico, esta técnica possui limitações. Por exemplo, as linhagens celulares estabelecidas para uso *in vitro* podem apresentar comportamentos metabólicos e farmacocinéticos diferentes do tecido cancerígeno. Adicionalmente, mesmo utilizando sistemas tridimensionais que fazem uso de cultura com matrigel e podem fornecer um modelo *in vitro* fisiologicamente mais relevante para a dinâmica e o ambiente tumoral, é preciso reconhecer que os tumores em si são envoltos por suporte mesenquimal, elementos vasculares, matriz extracelular e outros tipos celulares que podem favorecer seu crescimento³⁹.

Nos ensaios podem ser utilizadas as células uroteliais “normais” imortalizadas, que representam uma forma de controle importante na pesquisa desta doença e proporcionam uma oportunidade de se avaliar a carcinogênese *in vitro*. Adicionalmente, quando estas células imortalizadas são tratadas com cancerígenos, sub-linhagens com tumorigenicidade aumentada são criadas. Mesmo reconhecendo as limitações do modelo para pesquisa, essas linhagens são úteis como controle “normal” ou benigno, ou para estudar alterações genéticas e morfológicas⁴⁰.

Muitas linhagens celulares originadas de carcinomas uroteliais de alto grau/estágio avançado também estão disponíveis para estudo. Estas células variam em morfologia, mutações/deleções, características epiteliais e mesenquimais, padrão de crescimento, e outras características como o potencial invasivo e metastático. Quando uma linhagem celular com comportamento cancerígeno é escolhida, é essencial que seja levado em consideração as vantagens e desvantagens do modelo⁴¹.

A atividade citotóxica das drogas estabelecida em cultura de células tumorais pode ser avaliada através de métodos de observação de variações da morfologia celular, da viabilidade celular, e do metabolismo celular após tratamento⁴². Reconhecendo as limitações dos ensaios *in vitro*, mesmo assim, ainda são utilizados como ferramentas essenciais de avaliação das alterações moleculares em estudos e dos efeitos pioneiros que as células sofrem quando em contato com o composto estudado.

3.4. Importância da Aloe vera em uso para tratamentos terapêuticos

A aloe vera L. (nome dado por Carl Von Linne em 1720, sendo atualmente referida como *Aloe barbadensis* Miller), popularmente conhecida

como babosa, é uma planta pertencente à família Liliaceae⁴³ e também, a espécie mais conhecida dentre as plantas suculentas do gênero Aloe⁴⁴. Há mais de 3.500 anos plantas deste gênero são empregadas pelo homem para tratar ou prevenir diferentes doenças, e como já mencionado anteriormente, estão entre as 25 espécies mais utilizadas no Brasil pela população em geral para estes fins, ou seja, a exposição sem fiscalização adequada é intensa.

Embora pouco se saiba sobre sua eficácia terapêutica e modo de ação, essa espécie vegetal tem uso difundido na forma de chás e as chamadas “garrafadas”. Adicionalmente, compostos da planta estão em vários produtos de consumo humano, notadamente produtos nutricionais (e.g., para emagrecimento e suplementos alimentares), cosméticos (e.g., sabonetes, xampus) e unguentos.

A folha da aloe vera é composta principalmente de água (99,0%-99,5%); o material sólido restante (0,5%-1,0%) contém aproximadamente 75 diferentes compostos potencialmente bioativos, incluindo vitaminas, minerais, enzimas, polissacarídeos simples e complexos, compostos fenólicos, e ácidos orgânicos⁴⁵. As propriedades nutricionais e terapêuticas têm sido principalmente atribuídas aos polissacarídeos presentes no extrato da folha desta planta⁴⁶.

Vários estudos indicam que compostos da aloe vera podem acelerar a cicatrização e a deposição de matriz extracelular, justificando seu uso para o tratamento de feridas, queimaduras e na área cosmética. Sugere-se também que o emprego de aloe vera pode ser benéfico no diabetes, em virtude de ação anti-hiperglicêmica pela ativação da produção de insulina e

estimulação da expressão de genes relacionados ao metabolismo hepático da glicose e lipídeos⁴⁷. Outras propriedades já descritas, tanto em estudos *in vivo* quanto em estudos *in vitro*, incluem ação antiviral⁴⁸, antibacteriana⁴⁹, antifúngica⁵⁰, anti-inflamatória⁵¹, pró-cicatrizante⁵², antioxidante⁵³ e laxativa⁵⁴.

A despeito dos efeitos potencialmente benéficos do uso de aloe vera, há relatos de toxicidade hepática humana pelo consumo da planta⁵⁵. Recentemente a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) proibiu no Brasil a comercialização de alimentos que contenham o extrato da aloe vera. De acordo com seu Informe Técnico nº47 (de 16/Nov/2011),“(...) não há estudos toxicológicos adequados ou com resultados suficientes para comprovar a segurança do uso oral da substância na categoria de novos alimentos”. Assim, a autorização de comercialização de produtos com aloe vera está limitada a produtos de uso tópico⁵⁶.

A necessidade de estudos adicionais sobre a planta é também indicada pela agência norte-americana de Administração de Drogas e Alimentos (*U.S. Food and Drug Administration - FDA*)⁵⁷ e pelo Instituto Nacional do Câncer dos EUA (*National Cancer Institute - NCI*). Por essa razão, e considerando grande exposição humana, nos EUA foi exigido que a aloe fosse submetida a avaliação no Programa Nacional de Toxicologia (NTP).

Os resultados obtidos pelo NTP sugerem que determinados componentes da planta podem induzir o aparecimento de tumores⁵⁸. Em ratos F344/N, a ingestão de diferentes doses do extrato aquoso da planta por dois anos provocou o desenvolvimento de adenomas e carcinomas do

intestino grosso (NTP, 2011). Em ratos F344/N e em camundongos B6C3F1 foi observado aumento da incidência de hiperplasia na mucosa colônica⁵⁹. Esses resultados sugerem que componentes da aloe vera têm propriedades irritantes da mucosa intestinal para as espécies de roedores utilizadas, e cancerígenas para o intestino grosso de ratos.

Em estudos com células de linfoma de ratos L5178Y, observou-se que as antraquinonas presentes no extrato da planta podem competir com sítios de ligação da topoisomerase II ao DNA ou interagir com a mesma, de modo a inibir sua ação e eventualmente ocasionar quebras cromossômicas⁶⁰. Em tempo, a ingestão do gel da aloe vera por ratos durante 5,5 meses resultou em diminuição na concentração sérica do paratormônio e da calcitonina, indicando efeito potencial no metabolismo do cálcio⁶¹. Em camundongos albinos Swiss, o extrato da aloe vera apresentou a maior toxicidade oral (DL50 = 120,65 mg/kg) dentre 21 plantas testadas⁶².

O extrato da aloe vera é uma mistura complexa de compostos bioativos. Esse extrato pode variar em termos de composição e concentração de seus compostos, de acordo com clima, pH e minerais existentes no solo, etc., fazendo com que seus efeitos e intensidades possam ser diferentes. Assim, o estudo de compostos isolados do extrato de aloe vera pode auxiliar na elucidação dos efeitos relacionados ao consumo da planta (quer sejam eles terapêuticos ou tóxicos), bem como seus mecanismos de ação. Dentre os compostos da aloe vera mais estudados destaca-se o aloe-emodin, que tem sido relacionado com as possíveis ações antimicrobianas e antitumorais da planta.

3.5. O Aloe-emodin como uma droga antitumoral em potencial

Em contraposição aos dados de potencial cancerígeno previamente mencionados, o aloe-emodin (1,8-dehidro-3-[hidroximetil]-antraquinona) é um composto pertencente ao grupo das antraquinonas⁶³, sendo também um dos componentes da aloe vera que tem sido avaliado em relação a uma possível ação antineoplásica. Além das propriedades terapêuticas descritas para esses compostos como atividades antifúngica, antibacteriana, antiviral e laxativas, destacam-se os efeitos antitumorais⁶⁴ para as antraquinonas, incluindo o aloe-emodin, comumente associado à indução de morte celular por apoptose⁶⁵ de forma dose-dependente^{66,67}. Este grupo de compostos bioativos naturais adicionalmente são encontrados em outras plantas com uso em medicina tradicional difundido na população, como a sena (*Senna alexandrina* Mill), a portulaca (*Portulaca oleracea* L.) e na ruibarbo (*Rheum palmatum* L.)⁶⁸.

A formação do aloe-emodin ocorre a partir da quebra da ligação β -C-glicosil de duas antraquinonas livres presentes no extrato da aloe vera (aloin A e aloin B), por meio de sua hidrólise pela flora bacteriana intestinal de humanos e mais. A capacidade das antraquinonas em serem absorvidas no intestino delgado parece ser determinante para seu potencial toxicológico⁶⁹.

O mecanismo mais estudado para o suposto efeito antitumoral relatado para o aloe-emodin é a inibição do crescimento celular, descrito em diferentes linhagens cancerígenas cultivadas *in vitro*. Foi relatado que as linhagens SVG e U-373MG de glioma apresentam elevada sensibilidade ao composto, diminuindo sua viabilidade quando tratadas como aloe-emodin⁷⁰.

Um outro estudo feito com células epiteliais brônquicas transformadas demonstrou que o aloe-emodin é 25 vezes mais citotóxico nestas células em comparação com células normais⁷¹. Adicionalmente, o composto demonstrou ser mais citotóxico em linhagens de carcinoma de células escamosas orais e tumores de glândula salivar do que contra fibroblastos gengivais normais⁷², sugerindo uma efetividade maior em células neoplásicas. A seletividade do aloe-emodin para células tumorais pode ser por meio de um processo de incorporação do composto mediado por receptores nestas células, proporcionando o acesso às estruturas intracelulares.

Há evidências de que o aloe-emodin possui atividade estrogênica e modula a proliferação de células de câncer de mama, atuando no receptor de estrógeno α (*estrogen receptor 1 - ESR1*) de modo análogo a um fitoestrógeno⁷³. Adicionalmente, o composto modulou a proliferação celular de células humanas leucêmicas U937⁷⁴ e células PC3 de câncer de próstata⁷⁵ de forma dose-dependente, além de reduzir a proliferação de células de tumores neuroectodermis⁷⁶.

Outra propriedade já descrita para o aloe-emodin é a sua capacidade de interromper o ciclo celular nas células cancerígenas. Nas células normais que se dividem ativamente, sabe-se que a passagem de uma fase para outra do ciclo celular é controlada por fatores de regulação - de modo geral protéicos – que atuam nos chamados pontos de checagem do ciclo celular. Dentre essas proteínas, se destacam as ciclinas, que controlam a passagem da fase G1 para a fase S e da G2 para a mitose. Se em algumas dessas fases houver alguma anomalia, por exemplo, algum dano no DNA, o

ciclo é interrompido até que o defeito seja reparado e o ciclo celular possa continuar. Caso contrário, a célula é conduzida à morte celular por apoptose. Outro ponto de checagem é o da mitose, promovendo a distribuição correta dos cromossomos pelas células-filhas. Em resumo, o ciclo celular está sob controle de diversos genes e o resultado é a produção e diferenciação das células. Os pontos de checagem correspondem, assim, a mecanismos que impedem a formação de células anômalas.

A origem das células cancerígenas está associada a problemas na regulação do ciclo celular. Alterações do funcionamento de genes controladores do ciclo celular, em decorrência de mutações, são relacionados ao surgimento de um tumor. Duas classes de genes, os proto-oncogenes (como o RAS e MYC - *v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog*) e os genes supressores de tumor (como o TP53 e Rb - *retinoblastoma 1 – RB1*) são os mais diretamente relacionados à regulação do ciclo celular. Os proto-oncogenes são responsáveis pela produção de proteínas que atuam na estimulação do ciclo celular, enquanto os genes supressores de tumor são responsáveis pela produção de proteínas que atuam inibindo o ciclo celular⁷⁷.

Assim, umas das abordagens mais importantes para as quimioterapias é inibir a progressão do ciclo celular em células tumorais. Já foram descritos efeitos do aloe-emodin atuando na interrupção do ciclo celular nas fases G2/M em várias linhagens cancerígenas, relacionada com aumento da expressão das proteínas p53 e p21, que são regulatórias do ciclo. Estes efeitos foram demonstrados em algumas células cancerígenas humanas como a de cólon WiDr⁷⁸; de câncer oral KB⁷⁹ e em células leucêmicas HL-

60⁸⁰. Além disso, outros estudos encontraram que o aloe-emodin provoca interrupção do ciclo celular de G1/S em alguns tipos de células cancerígenas como as de hepatoma Hep G2⁸¹ e glioma U-373MG⁸², por meio de uma inibição da proteína quinase C (*protein kinase C, alpha - PRKCA*). Esta é uma proteína que participa na regulação da proliferação celular em resposta a estímulos de fatores de crescimento, fármacos, entre outros, e encontra-se hiperexpressa em células tumorais. Assim, agentes capazes de inibi-la podem bloquear a progressão de tumores.

A interrupção do ciclo celular causada pelo aloe-emodin está comumente relacionada com a indução de apoptose pelo composto por meio da ativação de caspases. Muitos estudos tem sugerido a via mitocondrial como a principal responsável por esse processo. Em um estudo feito em linhagem celular de carcinoma de pulmão H460, foi relatado que o aloe-emodin induz apoptose por diminuir os níveis da bcl-2 (*B-cell CLL/lymphoma 2 – BCL2*), uma proteína anti-apoptótica, e provocar aumento de caspase-3 (*caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase – CASP3*)⁸³. Em outro estudo realizado em células de câncer nasofaríngeo, o aloe-emodin induziu apoptose por meio de ativação de bax (*BCL2-associated X protein – BAX*), uma proteína pró-apoptótica e diminuição dos níveis de bcl-2, gerando também um aumento de caspases-3⁸⁴. Em células de carcinoma gástrico (AGS e NCI-N87)⁸⁵ a liberação de caspase-3 também foi observada.

Outro mecanismo relacionado ao aloe-emodin é a indução de danos no DNA em células cancerígenas por meio de estresse oxidativo, evidenciado em células de carcinoma pulmonar H460⁸⁶. Esse estudo demonstrou que o

composto aumenta a sensibilidade destas células à terapia por fotodinâmica, uma terapia alternativa para tumores malignos localizados que envolve um agente fotosensível e moléculas oxidativas. Foi observado que o aloe-emodin é foto-ativado, induzindo instabilidade da membrana mitocondrial e liberação de citocromo c (*C-reactive protein, pentraxin-related – CRP*), que ativa sinais apoptóticos. Essas observações demonstram que a geração de estresse oxidativo é uma ação importante no processo de sensibilização do aloe-emodin contra agentes quimioterápicos⁸⁷.

Resistência aos químicos é um fator que limita as taxas de sucesso de algumas estratégias de tratamento oncológico com quimioterapia. Diferentes combinações de drogas podem propiciar melhor resposta antitumoral em carcinomas. É sugerido que o aloe-emodin pode sensibilizar células neoplásicas à quimioterapia: em células do carcinoma de Merkel, por exemplo, foi relatado que o composto potencializa efeitos de da cisplatina, doxorubicina e 5-fluorocil, agentes quimioterápicos de uso comum⁸⁸. Entretanto, esse mecanismo de sinergismo ainda é pouco estudado.

Os mecanismos moleculares envolvidos nos efeitos antiproliferativos do aloe-emodin envolvem o gene supressor tumoral TP53. Muitas células neoplásicas evadem o processo de apoptose e interrupção do ciclo celular via mutações no gene TP53. A expressão de p53 leva à ativação de outro gene supressor tumoral, o p21 (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1A – CDKN1A*), o qual contribui para interrupção do ciclo celular por inibir o complexo ciclina-cdk, culminando com um processo apoptótico⁸⁹.

As vias de sinalização das proteínas MAPK quinases possuem um papel importante na regulação da proliferação celular, apoptose e migração celular. Os membros das MAPK quinases consistem em três classes de proteínas, as quinases N- terminais JNKs (*mitogen-activated protein kinase 8 – MAPK8*), as proteínas reguladas por sinais extracelulares ERKs (*mitogen-activated protein kinase 3 – MAPK3 e mitogen-activated protein kinase 1 – MAPK1*) e p38 (*mitogen-activated protein kinase 14 – MPK14*). Estas proteínas estão descritas em vários trabalhos evidenciando seu envolvimento na atividade antiproliferativa do aloe-emodin⁹⁰. Como exemplo, a exposição de células invasivas de carcinoma nasofaríngeo ao aloe-emodin resultou em diminuição da sua capacidade migratória devido a uma inibição da via sinalizadora p38 MAPK-NF-κB e consequente inibição da expressão de matriz metaloproteinases (*matrix metalloproteinase 2 - MMP2*), enzimas relacionadas com a degradação de matriz extracelular, facilitando a invasão tumoral⁹¹.

Outras propriedades à parte também já foram relacionadas ao aloe-emodin. Em um estudo feito com células de hepatocarcinoma Huh-7, o composto exibiu um efeito antiproliferativo via diminuição da expressão de calpaína-2 (*calpain 2 – CAPN2*) e da enzima ubiquitina ligase (*ubiquitin protein ligase E3A – UBE3A*), proteínas associadas com a via de apoptose⁹². Um outro estudo demonstrou que o tratamento com aloe-emodin inibe a proliferação de pré-adipócitos e diminui a acumulação de lipídeos nestas células por impedir a maturação dos adipócitos, sugerindo ser um agente em potencial para tratamento de obesidade⁹³. Adicionalmente, o aloe-emodin demonstrou ser capaz de antagonizar a

citotoxicidade causada pela exarcebação da atividade do fator de necrose tumoral (*tumor necrosis fator - TNF*) em reações inflamatórias, sugerindo um efeito citoprotetor⁹⁴

Estes resultados mencionados sugerem que diversos mecanismos podem estar relacionados com os efeitos antiproliferativos do composto, entretanto o grande potencial do aloe-emodin como um futuro agente antitumoral é destacado em todos os mecanismos e trabalhos.

Em um estudo feito com ratos fêmeas e machos SPF Brown-Norway, foi administrado oralmente uma dose de 4.5 mg/kg de ¹⁴C-aloe-emodin em uma suspensão com tragacanto (0.3%). Amostra de sangue, fezes, urina e os órgãos foram coletados para avaliar a distribuição do composto. Os resultados mostraram que 20% a 30% da dose foi excretada na urina, indicando possível exposição de células uroteliais ao aloe-emodin⁹⁵. Entretanto, apenas um estudo identificado na literatura avalia efeitos do aloe-emodin nessas células. Nesse estudo, demonstrou-se que o aloe-emodin inibe a viabilidade de células uroteliais neoplásicas T24, induzindo sua apoptose pela expressão de p53, com conseqüente aumento de p21, Bax, citocromo c e Fas (*Fas cell surface death receptor - FAS*), além de diminuição de bcl-2. O mesmo trabalho estimou em 20 µM a IC50 da substância⁹⁶.

O uso da aloe vera está enraizado na cultura popular, de modo que há ampla exposição humana a essa planta. Por outro lado, são controversos os resultados acerca das propriedades da aloe vera, provavelmente em decorrência da diversidade de compostos e variações na composição da planta. Foi sugerido que o aloe-emodin apresenta potencial antiproliferativo

para determinadas linhagens neoplásicas. Entretanto, não há informações suficientes sobre seus efeitos em células uroteliais. Assim sendo, o presente estudo visa avaliar o efeito do aloe-emodin em células uroteliais não neoplásicas e neoplásicas malignas tratadas *in vitro*, relatando a importância da ação deste composto como uma alternativa para fortalecer os tratamentos atuais para o carcinoma urotelial.

Objetivos

4. Objetivos

4.1 Objetivo Geral

Face ao amplo uso tradicional de aloe vera por populações humanas, o presente estudo visa avaliar a hipótese de que o tratamento com aloe emodin modifica o comportamento de células uroteliais neoplásicas cultivadas in vitro, com eventual papel antineoplásico.

4.2 Objetivos Específicos

1. Determinar a IC50 de exposição in vitro de aloe emodin para as diferentes células uroteliais humanas neoplásicas;
2. Comparar as eventuais diferenças observadas no comportamento in vitro de células uroteliais tratadas com aloe emodin em relação às células não tratadas.

Material e Métodos

5. Material e Métodos

O presente estudo visa avaliar a hipótese de que o tratamento com aloe-emodin modifica o comportamento de células uroteliais cultivadas *in vitro*, com eventual papel citotóxico e antineoplásico. Assim sendo, a taxa de proliferação celular e viabilidade de células tratadas e não-tratadas cultivadas *in vitro* foram selecionadas como parâmetros relevantes para avaliação da hipótese de trabalho.

5.1 Material teste

Para tratamento das linhagens celulares foi empregado o aloe-emodin, CAS#481-72-1, pureza 98,0%, peso molecular 270,24 g/mol, fórmula $C_{15}H_{10}O_5$ (Adooq Bioscience, Irvine, CA, USA), diluído em 0,1% em DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

5.2 Linhagens celulares e padronização do cultivo *in vitro*

Durante o estudo foi efetuada análise da viabilidade de células das linhagens RT4, 5637 e T24 expostas *in vitro* ao aloe-emodin. Todas as linhagens foram mantidas em meios de cultivo celular apropriados (indicados a seguir), acrescidos de gentamicina 0,4% e incubadas a 37°C com 5% CO₂.

A linhagem RT4 (gerada de papiloma urotelial de paciente masculino de 63 anos de idade) foi cultivada em meio DMEM suplementado com 20% de FBS. A linhagem 5637 (gerada a partir de um carcinoma urotelial de grau II de paciente masculino de 68 anos de idade) foi cultivada em meio RPMI 1640 suplementado com 20% de FBS. A linhagem T24 (obtida de carcinoma de grau III de paciente feminina de 81 anos de idade) foi

cultivada em meio DMEM suplementado com 10% de FBS. Todas são linhagens de células aderentes, conforme ilustrado na Figura 1.

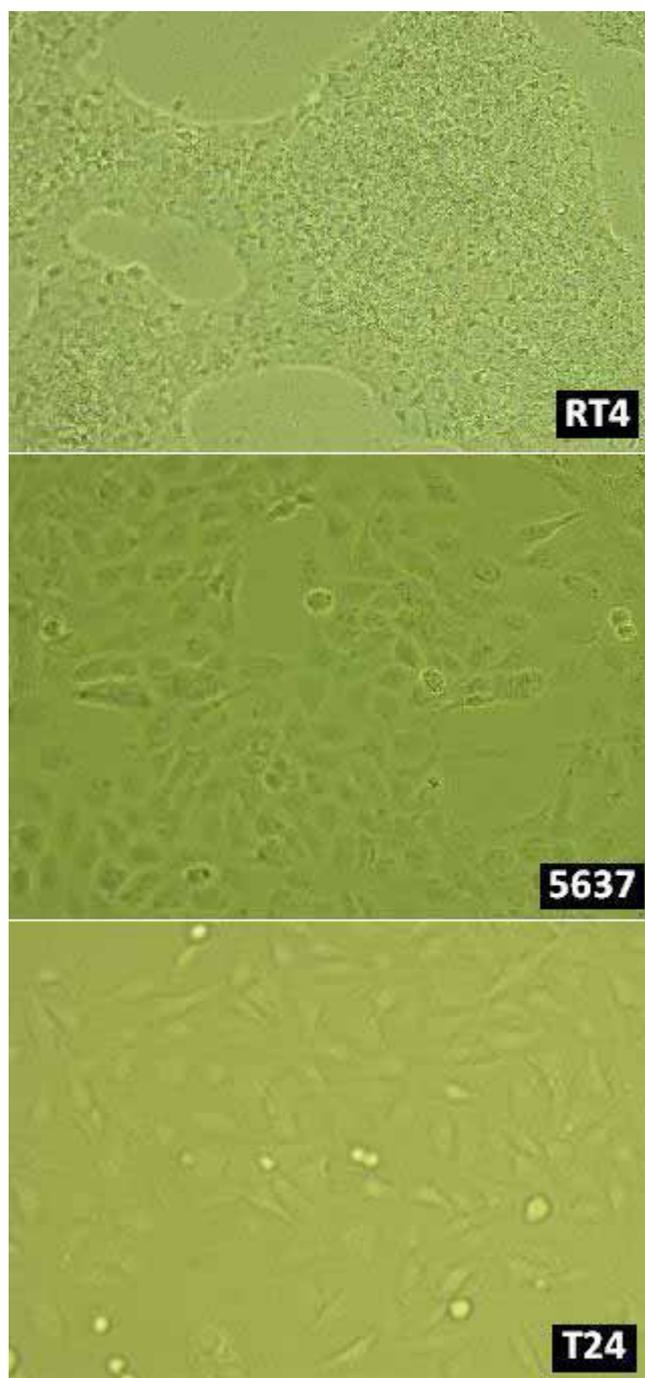


Figura 1 - Aspecto das linhagens celulares utilizadas no estudo avaliadas em microscopia óptica convencional. Todas em aumento de 200x.

Todas as linhagens foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Daisy Maria Fávero Salvadori (Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP) e

são originalmente provenientes do Banco de Células da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

5.3 Determinação da concentração de células para experimentação

Inicialmente foi efetuada uma determinação da quantidade ideal de células requerida a serem semeadas para os experimentos subsequentes. Para tanto, as células foram semeadas em concentrações crescentes em uma placa de 96 poços. Como as linhagens RT4 e 5637 possuem um crescimento mais lento, optou-se por testar até concentrações mais altas. Foram então preparadas placas com 3×10^3 ; $3,5 \times 10^3$; 4×10^3 ; $4,5 \times 10^3$; 5×10^3 ; $5,5 \times 10^3$; 6×10^3 ; $6,5 \times 10^3$; 7×10^3 ; $7,5 \times 10^3$; 8×10^3 ; $8,5 \times 10^3$; 9×10^3 ; $9,5 \times 10^3$; 1×10^4 ; $1,05 \times 10^4$; $1,1 \times 10^4$; $1,15 \times 10^4$ e $1,2 \times 10^4$ células por poço. Após semeadura, as células foram monitoradas por 72h, quando foi então definida a concentração ideal que seria empregada para cada linhagem celular nos experimentos de estimativa de viabilidade celular. O mesmo procedimento foi adotado para a linhagem T24; entretanto, face ao crescimento rápido, as concentrações iniciais testadas foram 2×10^3 ; $2,5 \times 10^3$; 3×10^3 ; $3,5 \times 10^3$; 4×10^3 ; $4,5 \times 10^3$ e 5×10^3 células por poço.

5.4 Preparo da solução de aloe-emodin

Após a determinação da quantidade ideal de células a serem semeadas para cada linhagem, foi estabelecido um protocolo para a avaliação *in vitro* da citotoxicidade do aloe-emodin e para determinação das taxas de viabilidade das células não-tratadas em relação às células tratadas com diferentes concentrações do composto. Nesse protocolo foram determinadas as concentrações desejadas e ajustados os procedimentos

de diluição do aloe-emodin, de modo a melhorar sua solubilidade em meio aquoso.

Para a realização dos experimentos de avaliação dos efeitos da exposição das linhagens analisadas ao aloe-emodin, foi preparada uma solução-mãe do composto a 10 mM em 100% DMSO, a fim de se atingir altas concentrações a partir de sua diluição. Para tanto foram empregados 2,7 mg de aloe-emodin em 1 mL de DMSO. Como a solução estava em 100% DMSO e, nas células, é recomendável utilizar apenas 0,1%, foi necessário diluir em 1000x (100 µL da solução em 9,9 mL de meio) para atingir a concentração adequada do veículo. A partir desta diluição, a solução final é de 100 µM a 0,1% DMSO, sendo passível de aplicação às amostras. Esta solução foi usada para tratamento das linhagens 5637 e T24. Para tratamento da RT4, que exigiu concentrações mais altas para o tratamento, foi preparada uma solução final de 200 µM a 0,1% DMSO (200 µL da solução-mãe em 9,8 mL de meio). As demais concentrações foram preparadas através de diluição em meio acrescido de 0,1% DMSO, para que esta concentração se mantivesse constante em todas as amostras.

5.5. Avaliação da citotoxicidade do aloe-emodin

A avaliação da viabilidade celular de cada linhagem celular exposta do aloe-emodin *in vitro* foi determinada utilizando o ensaio colorimétrico de metiltiazol tetrazolio (MTT), que consiste na absorção do sal de 1-(4,5-Dimetiltiazol-2-il) -3,5-difenilformazan pelas células vivas e sua redução no interior da mitocôndria, originando o formazan. O método consiste basicamente em adicionar 20µL do MTT diluído a 5 mg/mL em cada poço. Após 3-5 horas de incubação, o meio é retirado e os precipitados de cristais

de formazan são diluídos em 200 μ L de DMSO. A coloração obtida nos poços foi lida em espectrofotômetro em 570nm.

As células foram semeadas em placa de 96 poços; após 24h foram expostas a diferentes concentrações de aloe-emodin e monitoradas por 72h, quando foram preparadas para leitura em espectrofotômetro. Cada condição experimental foi avaliada em quintuplicatas. A referência equivalente a 100% de viabilidade foi dada pela média dos valores obtidos para exposição das células somente ao veículo (0.1% DMSO, sem aloe-emodin). Cada teste foi repetido 3 vezes.

Resultados

6. Resultados

6.1 Concentração ideal de células a serem semeadas para cada linhagem

Determinou-se que a concentração ideal de células para cada poço em placa de 96 posições seria conforme se segue: 1×10^4 células para RT4; $3,5 \times 10^3$ células para 5637; e 3×10^3 células para a linhagem T24. Ao final de 72h (duração do tratamento com aloe-emodin), essas quantidades permitiriam que células não-tratadas alcancem aproximadamente 80-90% de confluência em cultivo. Com base nesses resultados, nota-se que as células T24 apresentam velocidade de crescimento *in vitro* maior que células 5637 e RT4. Esta última, em particular, apresentou o maior tempo de duplicação em comparação às demais linhagens utilizadas. Os valores obtidos para concentração ideal de células semeadas para essas linhagens equivale ao que já foi reportado na literatura⁹⁷.

6.2 Avaliação da exposição *in vitro* ao aloe-emodin

O aloe-emodin apresentou citotoxicidade nas linhagens uroteliais tal que $T24 > 5637 > RT4$. Os valores de IC₅₀ foram 22,2 μ M, 32,1 μ M e 148,8 μ M, respectivamente (Figura 2; Tabela 1).

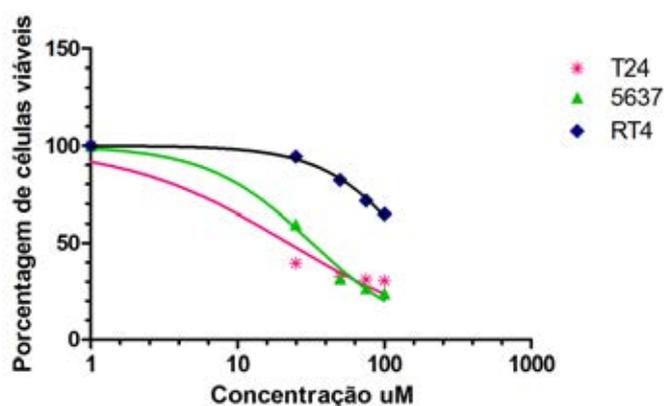


Figura 2 – Testes de citotoxicidade realizados com as linhagens uroteliais T24, 5637 e RT4. Média obtida de 3 experimentos.

Tabela 1 – IC50 obtida a partir da média de três experimentos independentes de viabilidade celular realizados com as três diferentes linhagens. O valor de R² apresentado indica confiabilidade da amostra em relação à estatística utilizada (regressão não-linear).

Linhagem	IC50	R ²
T24	22,15 µM	0,94
5637	32,12 µM	0,98
RT4	148,20 µM	0,99

Devido ao fato da citotoxicidade da linhagem RT4 ter sido estimada em 148,2 µM e a concentração máxima utilizada no tratamento ser 100 µM, o experimento foi repetido sob as mesmas condições, mas utilizando concentrações mais altas (Figura 3).

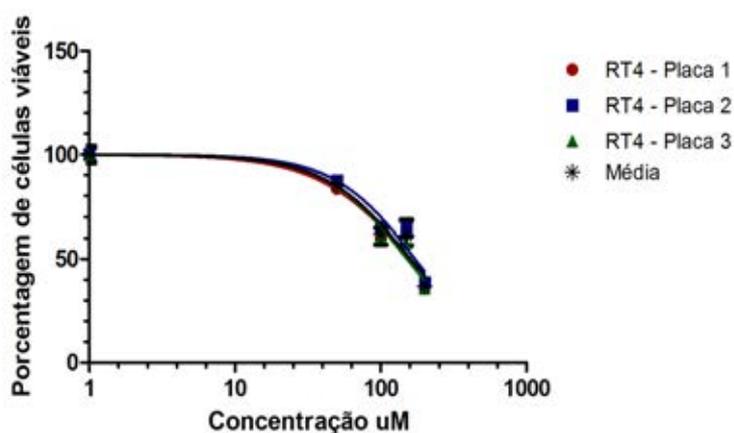


Figura 3 – Experimentos para obtenção de IC50 na linhagem RT4, utilizando concentrações até 200 µM.

Tabela 2 – Valores de IC50 obtidos para cada experimento feito com a linhagem RT4 e média dos três experimentos independentes, utilizando até a concentração de 200 µM de aloe-emodin. Adicionalmente, é apresentado o valor de R², o qual indica confiabilidade da amostra em relação à estatística utilizada (regressão não-linear).

Experimento	IC50	R ²
1	160,2 µM	0,92
2	171,7 µM	0,93
3	151,6 µM	0,96
Média	160,2 µM	0,94

A média dos três tratamentos apresentou uma IC50 de aproximadamente 160 µM, na mesma magnitude dos resultados obtidos

anteriormente (148,2 μM). Como a curva do primeiro experimento apresentou um R^2 mais próximo de 1, indicando confiabilidade do resultado, a IC_{50} originalmente encontrada para a linhagem RT4 foi mantida.

Discussão

7. Discussão

O câncer de bexiga é uma doença caracterizada por alta recorrência e resistência aos tratamentos quimioterápicos nos estágios mais avançados, tornando a taxa de sobrevivência dos pacientes muito baixa e dificultando o tratamento. Apesar de alguns avanços no tratamento da doença, atualmente a técnica terapêutica mais efetivas é a cirurgia endoscópica para retirada do tumor⁹⁸. Para evitar as recorrências dos carcinomas de células transitórias, terapias complementares são utilizadas para aumentar a eficácia da quimioterapia, como a administração conjunta com outras drogas ou procedimentos que possam contribuir no tratamento. A dificuldade no tratamento desse tipo de câncer e a alta resistência a quimioterapias torna essencial um melhor entendimento da biologia da doença para identificação de terapias mais efetivas.

O presente estudo avaliou a ação que o composto aloe-emodin exerce sobre a viabilidade celular de diferentes linhagens de células transitórias neoplásicas humanas de bexiga. Esse composto já foi relacionado a uma ação antiproliferativa em linhagens de diferentes origens e tem se destacado por um possível efeito apoptótico e papel antineoplásico. Assim, especula-se sobre a possibilidade de ser utilizado como potencial agente antineoplásico⁹⁹.

A partir da avaliação da viabilidade celular por meio do ensaio de MTT, foram estimados os valores de IC50 para cada linhagem, a fim de comparar o efeito do aloe-emodin entre elas. Os resultados encontrados foram de aproximadamente 160 μM para a RT4, 32 μM para a 5637 e 22 μM para a

T24. Foi notada diminuição da viabilidade celular das linhagens testadas de forma dose-dependente. Entretanto, a resposta das células uroteliais à ação do composto foi diferente entre as linhagens estudadas.

A linhagem RT4, proveniente de um papiloma urotelial, demonstrou maior resistência aos efeitos citotóxicos do aloe-emodin, evidenciada pelo maior valor de IC₅₀ (160 µM). A 5637, proveniente de um carcinoma urotelial de grau II, demonstrou maior susceptibilidade em relação à RT4, mas menor em relação à T24. Esta última, linhagem originada de um carcinoma de grau III, revelou-se a linhagem mais sensível aos efeitos do aloe-emodin, expressa pelo menor valor de IC₅₀ estimado (22 µM), ainda que muito próximo do valor estimado pela linhagem 5637 (32 µM). Os resultados obtidos atestam que o efeito citotóxico do aloe-emodin foi mais relevante nas linhagens de células transformadas em relação à linhagem proveniente de neoplasia benigna.

Resultados semelhantes de citotoxicidade do aloe-emodin foram relatados em um estudo com a linhagem T24, no qual foi estimada IC₅₀ de aproximadamente 25 µM, em sintonia com o resultado do presente trabalho. Nesse estudo foi sugerido que o aloe-emodin induz apoptose p53-dependente nas células, culminando em aumento de p21, com consequente inibição de ciclina B1 (*cyclin B1 – CCNB1*), de modo que a célula ficaria estagnada na fase G2 do ciclo celular. Adicionalmente, foi relatado neste mesmo estudo aumento nos níveis de da proteína pró-apoptótica bax e redução da anti-apoptótica bcl-2, o que propicia formação do apoptossoma a partir do citocromo c liberado da mitocôndria, ativação de caspases efetoras e apoptose¹⁰⁰.

A linhagem RT4 apresentou maior resistência à ação do citotóxica do aloe-emodin em relação às outras linhagens. Essa linhagem possui *TP53* selvagem, de modo que seria de se esperar que apresentasse maior sensibilidade a tratamentos que estimulam a via intrínseca da apoptose, regulada por p53. A ativação dessa via é particularmente relevante na vigência de danos no DNA nuclear¹⁰¹.

Assumindo a apoptose como mecanismo relevante do efeito antineoplásico do aloe-emodin¹⁰⁰, os valores de IC50 estimados para as linhagens analisadas no presente estudo permitem supor que o composto deve aumentar a susceptibilidade à apoptose de células geneticamente comprometidas, como é o caso das células transformadas das linhagens 5637 e T24. Essa hipótese é subsidiada pela observação de maior resistência ao tratamento do aloe-emodin da linhagem RT4, cujas células são provenientes de neoplasia benigna e, portanto, apresentam patrimônio genético mais preservado. Por outro lado, não se pode descartar que outras propriedades biológicas peculiares de cada linhagem tenham contribuído nos resultados obtidos. Assim sendo, a avaliação de repertório maior de linhagens de neoplasias benignas e malignas de células uroteliais é requerida para elucidar essa questão.

Outra linha de raciocínio considera a observação de que a proteína supressora de tumor p21 pode inibir a progressão do ciclo celular em células neoplásicas de cólon deficientes *TP53*¹⁰². Foi sugerido que p21 se liga a PCNA (*proliferating cell nuclear antigen* – PCNA), proteína de estabilização do complexo de replicação do DNA, requerida na checagem de danos genéticos durante a fase G2 do ciclo celular. Ao complexo p21-

PCNA é acrescido o complexo Cdc2-ciclina B1, responsável pela progressão do ciclo de G2 para M. Um eventual aumento de p21 estimulado pelo aloe-emodin pode impedir a ligação do complexo Cdc2-ciclina B1 com o PCNA quando há algum dano ao DNA e assim, a célula ficaria estacionada na fase G2. Com as células impedidas de continuar seu metabolismo normal, outras proteínas responsáveis pela morte celular tornam-se ativas e a célula entra em processo apoptótico.

O principal resultado obtido com esse estudo foram as diferentes respostas citotóxicas das linhagens uroteliais, demonstrando comportamentos distintos quando expostas ao aloe-emodin. Não há relatos na literatura do tratamento das linhagens 5637 e RT4 com esse composto. Ainda, esse estudo ratificou a estimativa prévia de IC50 para a linhagem T24.

Devido aos seus efeitos citotóxicos sobre as células uroteliais, o aloe-emodin apresenta-se como um composto em potencial para estudos que envolvem o câncer de bexiga. Porém, devido aos efeitos inespecíficos à células neoplásicas apresentados, torna-se fundamental o melhor entendimento do mecanismo de ação real deste composto, a fim de usufruir de seus efeitos antiproliferativos, buscando estratégias mais efetivas contra o crescimento de células neoplásicas.

Referências Bibliográficas

8. Referências Bibliográficas

- ¹ Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise da Situação de Saúde. Sistema de informações sobre mortalidade. Disponível em: <<http://www.datasus.gov.br>>. Acesso em 15/06/2013.
- ² Kirkali Z., Chan T., Manoharan M., Algaba F., Busch C., Cheng L., Kiemenev L., Kriegmair M., Montironi R., Murphy WM., Sesterhenn IA., Tachibana M., Weider J. Bladder cancer: epidemiology, staging and grading, and diagnosis. *Urology* 2005 Dec; 66(6 Suppl 1): 4-34.
- ³ Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estatísticas do Câncer. Estimativa 2012: Incidência de Câncer no Brasil. INCA 2011. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>. Acesso em 15/06/2013.
- ⁴ Lewis AS. Everything you wanted to know about the bladder epithelium but were afraid to ask. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2000 Jun; 278(6): F867-74.
- ⁵ Chester JD., Hall GD., Forster M., Protheroe AS. Systemic chemotherapy for patients with bladder cancer: current controversies and future directions. *Cancer Treat Rev*. 2004 Jun; 30(4): 343-58.
- ⁶ Yu MC, Skipper PL, Tannenbaum SR, Chan KK, Ross RK [review]. Arylamines exposures and bladder cancer risk. *Mutat Res*. 2002; 506-507: 21-8.
- ⁷ Yokota J. Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis* 2000 Mar; 21(3): 497-503.
- ⁸ Kausch I., Bohle A. Molecular Aspects of bladder cancer III. Prognostic markers of bladder cancer. *Eur Urol*. 2002 Jan; 41(1): 15-29.
- ⁹ Baithun SI, Naase M, Blanes A, Diaz-Cano SJ. Molecular and kinetic features of transitional cell carcinomas of the bladder: biological and clinical implications. *Virchows Arch*. 2001 Mar; 438(3): 289-97.
- ¹⁰ Case RA., Hosker ME., McDonald DB., Pearson JT. Tumors of the urinary bladder in workmen engaged in the manufacture and use of certain dyestuff intermediates in the British chemical industry. I. The role of aniline, benzidine, alpha-naphthylamine, and beta-naphthylamine. *Br J Ind Med*. 1954 Apr; 11(2): 75-104.

-
- ¹¹ Stadler WM. Molecular events in the initiation and progression of bladder câncer. [Review] *Int J Oncol.* 1993; 3: 549-557.
- ¹² Johansson SL., Cohen SM. Epidemiology and etiology of bladder câncer. *Semin Surg Oncol.* 1997 Sep; 13(5): 291-8.
- ¹³ Messing EM, and Vaillancourt A: Hematuria screening for bladder cancer. *J Occup Med.* 1990 Sep; 32(9): 838–845.
- ¹⁴ Goessl C, Knispel HH, Miller K, *et al*: Is routine excretory urography necessary at first diagnosis of bladder cancer?. *J Urol.* 1997 Feb; 157(2): 480–481.
- ¹⁵ Thalmann GN, Sermier A, Rentsch C, Mohrle K, Cecchini MG, Studer UE. Urinary Interleukin-8 and 18 predict the response of superficial bladder cancer to intravesical therapy with bacillus Calmette-Guerin. *J Urol.* 2000 Dec; 164(6): 2129-33.
- ¹⁶ von der Maase H, Hansen SW, Roberts JT *et al*. Gemcitabine and cisplatin versus methotrexate, vinblastine, doxorubicin and cisplatin in advanced or metastatic bladder cancer: Results of a large, randomized, multinational, multicenter, phase III study. *J Clin Oncol.* 2000 Sep; 18(17): 3068-77.
- ¹⁷ Brandau S., Suttman H. Thirty years of BCG immunotherapy for non-muscle invasive bladder cancer: a success story with room for improvement. *Biomed Pharmacother.* 2007 Jul; 61(6): 299-305.
- ¹⁸ Botteman MF, Pashos CL, Redaelli A. The health economics of bladder câncer – a comprehensive review of the published literature. *Pharmacoeconomics.* 2003 Dec; 21(18): 1315-30.
- ¹⁹ Zembutsu H, Ohnishi Y, Tsunoda T, Furukawa Y, Katagir T, Ueyama Y, *et al*. Genome-wide cDNA microarray screening to correlate gene expression profiles with sensitivity of 85 human câncer xenografts to anticancer drugs. *Cancer Res.* 2002 Jan 15; 62(2): 518-27.
- ²⁰ Swerdlow, J. *Nature's Medicine. Plants That Heal*, National Geographic Society, 2000.
- ²¹ Pierpoint, W.S. Salicylic acid and its derivatives in plants: Medicines, metabolites and messenger molecules. *Adv. Bot. Res.* 20 1994; 163–235.
- ²² Rates SM. Plants as source of drugs. *Toxicon.* 2001 May; 39(5):603-13.

-
- ²³ Medeiros PM, Ladio AH, Albuquerque UP. Patterns of medicinal plant use by inhabitants of Brazilian urban and rural areas: A macroscale investigation based on available literature. *J Ethnopharmacol.* 2013 Nov 25; 150(2): 729-46.
- ²⁴ Maistro EL, Mota SF, Lima EB, Bernardes BM, Goulart FC. Genotoxicity and mutagenicity of *Rosmarinus officinalis* (Labiatae) essential oil in mammalian cells *in vivo*. *Genet Mol Res.* 2010 Oct 26; 9(4): 2113-22.
- ²⁵ J.G. Graham, M.L. Quinn, D.S. Fabricant, N.R. Farnsworth. Plants used against cancer – an extension of the work of Jonathan Hartwell. *Journal of Ethnopharmacology* 2000 Dec; 73(3): 347–377.
- ²⁶ Cragg GM, Newman DJ. Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of Ethnopharmacology* 2005 Jul; 100: 72-79.
- ²⁷ Gueritte F, Fahy J. The vinca alkaloids. In: Cragg GM, Kingston DGI, Newman DJ. *Anticancer Agents from Natural Products*. Brunner-Routledge Psychology Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, PP. 123-136 (Capítulo 7).
- ²⁸ Lee KH, Xiao Z. Podophyllotoxins and analogs. In: Cragg GM, Kingston DGI, Newman DJ. *Anticancer Agents from Natural Products*. Brunner-Routledge Psychology Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, PP. 71088 (Capítulo 5).
- ²⁹ Kingston DGI. Taxol and its analogs. In: Cragg GM, Kingston DGI, Newman DJ. *Anticancer Agents from Natural Products*. Brunner-Routledge Psychology Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, PP. 89-122 (Capítulo 6).
- ³⁰ Rahier NJ, Thomas CJ, Hecht SM. Camptothecin and its analogs. In: Cragg GM, Kingston DGI, Newman DJ. *Anticancer Agents from Natural Products*. Brunner-Routledge Psychology Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, PP. 5-22 (Capítulo 2).
- ³¹ Itokawa H, Wang X, Lee KH. Homoharringtonine and related compounds. In: Cragg GM, Kingston DGI, Newman DJ. *Anticancer Agents from Natural Products*. Brunner-Routledge Psychology Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, PP. 47-70 (Capítulo 4).
- ³² Couch RD, Browing RG, Honda T, Gribble GW, Wright DL, Sporn MB, Anderson AC. Studies on the reactivity of CDDO, a promising new chemopreventive and chemotherapeutic agent: implications for a molecular

mechanism of action. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2005; 15: 2215-2219.

³³ Ravelo AG, Estevez-Braun A, Chevez-Orellana H, Perez-Sacau E, Mesa-Siverio D. Recent studies on natural products as anticancer agents. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2004; 4: 241-265.

³⁴ Cragg GM, Newman DJ. Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of Ethnopharmacology* 2005 Jul; 100: 72-79.

³⁵ Maciel MAM, Pinto AC, Veiga Jr VF, Grynberg NF, Echevarria A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Quim. Nova* 2001 Jul; 25(3): 429-438.

³⁶ Gebhardt R. In vitro screening of plant extracts and phytopharmaceuticals: novel approaches for the elucidation of active compounds and their mechanisms. *Planta Med.* 2000 Mar; 66(2): 99-105.

³⁷ Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev.* 2003; 3: 330-8.

³⁸ DeGraff DJ, Robinson VL, Shah JB, Brandt WD, Sonpavde G, Kang Y, Liebert M, Wu XR, Taylor JA 3rd; Translational Science Working Group of the BladderAdvocacy Network Think Tank. Current Preclinical Models for the Advancement of Translational Bladder Cancer Research. *Mol Cancer Ther.* 2013 Feb; 12(2): 121-30.

³⁹ Kyker KD, Culkun DJ, Hurst RE. A model for 3-dimensional growth of bladder cancers to investigate cell-matrix interactions. *Urol Oncol* 2003; 21: 255–61.

⁴⁰ Truschel ST, Ruiz WG, Shulman T, Pilewski J, Sun TT, Zeidel ML, et al. Primary uroepithelial cultures. A model system to analyze umbrella cell barrier function. *J Biol Chem* 1999; 274: 15020–9.

⁴¹ Killion JJ, Radinsky R, Fidler IJ. Orthotopic models are necessary to predict therapy of transplantable tumors in mice. *Cancer Metastasis Rev* 1998;17:279–84.

⁴² Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst.* 1990 Jul 4;82(13):1107-12.

⁴³ Debiasi C, Silva CG, Pescador R. Micropropagação de babosa (*Aloe vera* L.). *Rev. Bras. Pl. Med.* 2007 Dec 19; 9(1): 36-43.

-
- ⁴⁴ Harlev E, Nevo E, Lansky EP, Ofir R, Bishayee A. Anticancer Potencial of Aloes: Anti-oxidant, Antiproliferative, and Immunostimulatory Attributes. *Planta Med* 2012 Jun; 78(9): 843-852.
- ⁴⁵ Atherton P. Aloe vera: magic or medicine? *Nurs Stand* 1998 Jul 7; 12(41): 49-54.
- ⁴⁶ Ni Y, Turner D, Yates KM, Tizard I. Isolation and characterization of structural components of Aloe vera L. leaf pulp. *Int Immunopharmacol*. 2004 Dec 20; 4(14): 1745-55.
- ⁴⁷ Rajasekaran S, Ravi K, Sivagnanam K, Subramanian S. Beneficial effects of Aloe vera leaf gel extract on lipid profile status in rats with streptozotocin diabetes. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2006 Mar; 33(3): 232-237.
- ⁴⁸ Andersen DO, Weber ND, Wood SG, Hughes BG, Murray BK, North JA. *In vitro* viru-cidal activity of selected anthaquinones and anthaquinone derivatives. *Antiviral Res* 1991 Sep; 16(2): 185-196.
- ⁴⁹ Hatano T, Uebayashi H, Ito H, Shiota S, Tsuchiya T, Yoshida T. Phenolic constituents of Cassia seeds and antibacterial effect of some naphthalenes and anthaquinones on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Chem Pharm Bull* 1999 Aug; 47(8): 1121-1127.
- ⁵⁰ Agarwal SK, Singh SS, Verma S, Kumar S. Antifungal activity of anthaquinone deriva-tives from Rheum emodi. *J Ethnopharmacol* 2000 Sep; 72(1-2): 43-46.
- ⁵¹ Davis RH, Leitner MG, Russo JM, Byrne ME. Anti inflammatory activity of Aloe vera against a spectrum of irritants. *Journal of the American Podiatric Medical Association* 1989a Jun; 79(6): 263-276.
- ⁵² Atiba A, Nishimura M, Kakinuma S, Hiraoka T, Goryo M, Shimada Y, Ueno H, Uzuka Y. Aloe vera oral administration accelerates acute radiation-delayed wound healing by stimulating transforming growth factor- β and fibroblast growth factor production. *The American Journal of Surgery* 2011 Jun; 201(6): 809-818.
- ⁵³ El-Shemy HA, Aboul-Soud MAM, Nassr-Allah AA, Aboul-Enein KM, Kabash A, Yagi A. Antitumor properties and modulation of antioxidant enzymes activity by Aloe vera leaf active principles isolated via supercritical carbon dioxide extraction. *Curr Med Chem* 2010; 17(2): 129-138.

-
- ⁵⁴ Krumbiegel G, Schulz HU. Rhein and aloe-emodin kinetics from senna laxatives in man. *Pharmacology* 1993 Oct; 47(1): 120-124.
- ⁵⁵ Yang HN, Kim DJ, Kim YM, Kim BH, Sohn KM, Choi MJ, Choi YH. Aloe-induced toxic hepatitis. *J Korean Med Sci.* 2010 Mar; 25(3): 492-5.
- Curciarello J, Ortúzar S, Borzi S, Bosia D. Hepatitis aguda grave associada al consume de te de Aloe vera. *Gastroenterol Hepatol* 2008 Sep; 31(7): 436-8.
- Bottenberg MM, Wall GC, Harvey RL, Habib S. Oral Aloe vera-induced hepatitis. *Ann Pharmacother* 2007 Oct; 41(10): 1740-3.
- ⁵⁶ Brasil. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Informe Técnico n. 47, de 16 de novembro de 2011. Esclarecimentos sobre comercialização de Aloe vera (ba-bosa) e suas avaliações de segurança realizadas na área de alimentos da Anvisa. ANVISA Publicações Eletrônicas 2011. Disponível em: <<http://goo.gl/EFSNX>>. Acesso em: 03/Jul/2012.
- ⁵⁷ Steven Foster. Aloe vera: What the Science Says. Disponível em: <<http://nccam.nih.gov/health/aloevera>>. Acesso em: 03/07/2012.
- ⁵⁸ National Institutes of Health. NTP Technical report on the toxicology and carcinogenesis studies of a non decolorized whole leaf extract of *Aloe barbadensis* Miller (aloe vera) in F344/N rats and B6C3F1 mice (drinking water study). Publication No. 11-5919, 2011.
- ⁵⁹ Boudreau M, Mellick P, Olson G, Felton R, Thorn B, Beland F. Clear Evidence of Car-cinogenic Activity by a Whole Leaf Extract of *Aloe barbadensis* Miller (Aloe vera) in F344/N Rats. *Toxicol Sci.* 2013 Jan; 131(1): 26-39.
- ⁶⁰ Mueller SO, Stopper H. Characterization of the genotoxicity of anthraquinones in mammalian cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1999 Aug 5; 1428(2-3): 406-414.
- ⁶¹ Herlihy JT, Kim JD, Katu DN, Nelson JF, Ward WF, Ikeno Y, and Yu BP. Effects of aloe vera ingestion in the rat. II. Hormonal and metabolic characteristics. *Phytother Res* 1998b; 12: 355-360.
- ⁶² Logarto Parra A, Silva Yhebra R, Guerra Sardiñas I, Iglesias Buela L. Comparative study of the assay of Artemiasalina L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine* 2001 Sep; 8(5):395-400.

-
- ⁶³ Locatelli M. Anthraquinones: analytical techniques as a novel tool to investigate on the triggering of biological targets. *Curr Drug Targets* 2011 Mar; 12(3): 366–380.
- ⁶⁴ Di Luccia B, Manzo N, Vivo M, Galano E, Amoresano A, Crescenzi E, Pollice A, Tudisco R, Infascelli F, Calabrò V. A Biochemical and Cellular Approach to Explore the Antiproliferative and Prodifferentiative Activity of Aloe Arborescens Leaf Extract. *Phytother Res*. 2013 Feb; doi: 10.1002/ptr.4939.
- ⁶⁵ Wei WT, Chen H, Ni ZL, Liu HB, Tong HF, Fan L, Liu A, Qiu MX, Liu DL, Guo HC, Wang ZH, Lin SZ. Antitumor and apoptosis-promoting properties of emodin, an anthraquinone derivative from *Rheum officinale* Baill against pancreatic cancer in mice via inhibition of Akt activation. *Int. J. Oncol*. 2011 Dec; 39(6): 1381–1390.
- ⁶⁶ Grimaudo S, Tolomeu M, Gancitano RA, D'Alessandro N, Aiello E. Effects of highly purified anthraquinoid compounds from Aloe vera on sensitive and multidrug-resistant leukemia cells. *Oncol Rep* 1997 Mar; 4(2): 341-343.
- ⁶⁷ Lin KY, Uen YH. Aloe-emodin, an anthraquinone, in vitro inhibits proliferation and induces apoptosis in human colon carcinoma cells. *Oncol Lett* 2010 May; 1(3): 541-547.
- ⁶⁸ Huang Q, Lu G, Shen HM, Chung MC, Ong CN. Anti-cancer properties of anthraquinones from rhubarb. *Med Res Rev*. 2007 Sep; 27(5): 609-30.
- ⁶⁹ Sendelbach LE. A review of the toxicity and carcinogenicity of anthraquinone derivatives. *Toxicology* 1989 Aug; 57(3): 227-240.
- ⁷⁰ Acevedo-Duncan M, Russel C, Patel S, Patel R. Aloe-emodin modulates PKC iso-zymes, inhibits proliferation, and induces apoptosis in U-373MG glioma cells. *Int Immunopharmacol* 2004 Dec 20; 4(14): 1775-1784.
- ⁷¹ Chan TC, Chang CJ, Koonchanok NM, Geahlen RL. Selective inhibition of the growth of ras-transformed human bronchial epithelial cells by emodin, a protein-tyrosine kinase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993 Jun 30; 193(3):1152-8.
- ⁷² Shi YQ, Fukai T, Sakagami H, Kuroda J, Miyaoka R, Tamura M, Yoshida N, Nomura T. Cytotoxic and DNA damage-inducing activities of low molecular weight phenols from rhubarb. *Anticancer Res* 2001 Aug; 21(4A): 2847–2853.

-
- ⁷³ Huang PH, Huang CY, Chen MC, Lee YT, Yue CH, Wang HY, Lin H. Emodin and Aloe-Emodin Suppress Breast Cancer Cell Proliferation through ER α Inhibition. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013 Jun; 2013: 376123.
- ⁷⁴ Tabolacci C, Oliverio S, Lentini A, Rossi S, Galbiati A, Montesano C, Mattioli P, Provenzano B, Facchiano F, Beninati S. Aloe-emodin as antiproliferative and differentiating agent on human U937 monoblastic leukemia cells. *Life Sci*. 2011 Nov; 89(21-22): 812-20.
- ⁷⁵ Liu K, Park C, Li S, Lee KW, Liu H, He L, Soung NK, Ahn JS, Bode AM, Dong Z, Kim BY, Dong Z. Aloe-emodin suppresses prostate cancer by targeting the mTOR complex 2. *Carcinogenesis*. 2012 Jul; 33(7): 1406-11.
- ⁷⁶ Pecere T, Gazzola MV, Mucignat C, Parolin C, Vecchia FD, Cavaggioni A, Basso G, Diaspro A, Salvato B, Carli M, Palù G. Aloe-emodin Is a New Type of Anticancer Agent with Selective Activity against Neuroectodermal Tumors. *Cancer Res*. 2000 Jun; 60(11): 2800-4.
- ⁷⁷ Deane NG, Parker MA, Beauchamp RD. Cell proliferation: A matter of time and place. *Surgery*. 2005 Jul; 138(1): 1-7.
- ⁷⁸ Suboj P, Babykutty S, Srinivas P, Gopala S. Aloe Emodin Induces G2/M Cell Cycle Arrest and Apoptosis via Activation of Caspase-6 in Human Colon Cancer Cells. *Pharmacology*. 2012; 89(1-2): 91-8.
- ⁷⁹ Xiao B, Guo J, Liu D, Zhang S. Aloe-emodin induces in vitro G2/M arrest and alkaline phosphatase activation in human oral cancer KB cells. *Oral Oncol*. 2007 Oct; 43(9): 905-10.
- ⁸⁰ Chen HC, Hsieh WT, Chang WC, Chung JG. Aloe-emodin induced in vitro G2/M arrest of cell cycle in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Food Chem Toxicol*. 2004 Aug; 42(8): 1251-7.
- ⁸¹ Kuo PL, Lin TC, Lin CC. The antiproliferative activity of aloe-emodin is through p53-dependent and p21- dependent apoptotic pathway in human hepatoma cell lines. *Life Sci*. 2002 Sep; 71(16): 1879-92.
- ⁸² Acevedo-Duncan M, Russell C, Patel S, Patel R. Aloe-emodin modulates PKC isozymes, inhibits proliferation, and induces apoptosis in U-373MG glioma cells. *Int Immunopharmacol*. 2004 Dec; 4(14): 1775-84.

- ⁸³ Yeh FT, Wu CH, Lee HZ. Signaling pathway for aloe-emodin induced apoptosis in human H460 lung nonsmall carcinoma cell. *Int J Cancer*. 2003 Aug; 106(1): 26-33.
- ⁸⁴ Lin ML, Lu YC, Chung JG, Li YC, Wang SG, N G SH, Wu CY, Su HL, Chen SS. Aloe-emodin induces apoptosis of human nasopharyngeal carcinoma cells via caspase-8-mediated activation of the mitochondrial death pathway. *Cancer Lett*. 2010 May; 291(1): 46-58.
- ⁸⁵ Chen SH, Lin KY, Chang CC, Fang CL, Lin CP. Aloe-emodin-induced apoptosis in human gastric carcinoma cells. *Food Chem Toxicol*. 2007 Nov; 45(11): 2296-303.
- ⁸⁶ Lee HZ, Lin CJ, Yang WH, Leung WC, Chang SP. Aloe-emodin induced DNA damage through generation of reactive oxygen species in human lung carcinoma cells. *Cancer Lett* 2006 Jul; 239(1): 55–63.
- ⁸⁷ Lee HZ, Yang WH, Hour MJ, Wu CY, Peng WH, Bao BY, Han PH, Bau DT. Photodynamic activity of aloe-emodin induces resensitization of lung cancer cells to anoikis. *Eur J Pharmacol*. 2010 Dec; 648(1-3): 50-8.
- ⁸⁸ Fenig E, Nordenberg J, Beery E, Sulkes J, Wasserman L. Combined effect of aloe-emodin and chemotherapeutic agents on the proliferation of an adherent variant cell line of Merkel cell carcinoma. *Oncol Rep* 2004 Jan; 11(1): 213–217.
- ⁸⁹ Suboj P, Babykutty S, Srinivas P, Gopala S. Aloe Emodin Induces G2/M Cell Cycle Arrest and Apoptosis via Activation of Caspase-6 in Human Colon Cancer Cells. *Pharmacology*. 2012; 89(1-2): 91-8.
- ⁹⁰ Reddy KB, Nabha SM, Atanaskova N. Role of MAP kinase in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev* 2003 Dec; 22(4): 395–403.
- ⁹¹ Lin ML, Lu YC, Chung JG, Wang SG, Lin HT, Kang SE, Tang CH, Ko JL, Chen SS. Down-Regulation of MMP-2 Through the p38 MAPK-NF-kB-Dependent Pathway by Aloe-Emodin Leads to Inhibition of Nasopharyngeal Carcinoma Cell Invasion. *Mol Carcinog*. 2010 Sep; 49(9): 783-97.
- ⁹² Jeon W, Jeon YK, Nam MJ. Apoptosis by aloe-emodin is mediated through downregulation of calpain-2 and ubiquitin-protein ligase E3A in human hepatoma Huh-7 cells. *Cell Biol Int*. 2012 Feb; 36(2):163-7.

-
- ⁹³ Subash-Babu P, Alshatwi AA. Aloe-Emodin Inhibits Adipocyte Differentiation and Maturation During *In Vitro* Human Mesenchymal Stem Cell Adipogenesis. *J Biochem Mol Toxicol*. 2012 Aug; 26(8): 291-300.
- ⁹⁴ Harhaji L, Mijatovic S, Maksimovic-Ivanic D, Popadic D, Isakovic A, Todorovic-Markovic B, Trajkovic V. Aloe emodin inhibits the cytotoxic action of tumor necrosis factor. *Eur J Pharmacol*. 2007 Jul; 568(1-3): 248-59.
- ⁹⁵ Lang W. Pharmacokinetic-metabolic studies with ¹⁴C-aloe emodin after oral administration to male and female rats. *Pharmacology* 1993 Oct; 47(1): 110-119.
- ⁹⁶ Lin JG, Chen GW, Li TM, Chouh ST, Tan TW, Chung JG. Aloe-emodin induces apoptosis in T24 human bladder cancer cells through the p53 dependent apoptotic pathway. *J Urol* 2006 Jan; 175(1): 343-347.
- ⁹⁷ Riesenberger R, Fuchs C, Kriegmair M. Photodynamic effects of 5 aminolevulinic acid-induced porphyrin on human bladder carcinoma cells *in vitro*. *Eur J Cancer* 1996 Feb; 32A(2): 328-34.
- ⁹⁸ Thalmann GN, Sermier A, Rentsch C, Mohrle K, Cecchini MG, Studer UE. Urinary Interleukin-8 and 18 predict the response of superficial bladder cancer to intravesical therapy with bacillus Calmette-Guerin. *J Urol*. 2000 Dec; 164(6): 2129-33.
- ⁹⁹ Kuo PL, Lin TC, Lin CC. The antiproliferative activity of aloe-emodin is through p53-dependent and p21-dependent apoptotic pathway in human hepatoma cell lines. *Life Sci*. 2002 Sep 6; 71(16): 1879-92.
- ¹⁰⁰ Lin JG, Chen GW, Li TM, Chouh ST, Tan TW, Chung JG. Aloe-emodin induces apoptosis in T24 human bladder cancer cells through the p53 apoptotic pathway. *J Urol*. 2006 Jan; 175(1): 343-7.
- ¹⁰¹ Brandford CR, Zhus S, Ogawa H et al. P53 mutation correlates with cisplatin sensitivity in head and neck squamous cell carcinoma lines. *HeadNeck* 2003; 25: 654-61.
- ¹⁰² Ando T, Kawabe T, Ohara H, Ducommun B, Itoh M, Okamoto T. Involvement of the interaction between p21 and proliferating cell nuclear antigen for the maintenance of G2/M arrest after DNA damage. *J Biol Chem*. 2001 Nov 16; 276(46): 42971-7.