

EFEITO ANGIO/VASCULOGÊNICO DA ALOÍNA E COMPOSTOS DO PARÊNQUIMA CLOROFILIANO EXTRAÍDO DA BABOSA

Fernanda V. Berti¹, Carlos R. Rambo¹, Paulo F. Dias², Luismar M. Porto¹

Grupo de Engenharia Genômica

¹Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos

²Departamento de Biologia Celular Embriologia e Genética

Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário – CEP 88040-900 Florianópolis, SC

Telefone: +55(48) 3721-9713 – Email: fernanda@intelab.ufsc.br

Abstract: *Aloe vera* exhibits many medicinal properties due to the presence of metabolites found in the extracts of the reserve and chlorophyll parenchyma. The later is rich in anthraquinones, such as aloin. This work investigated the effects of the chlorophyll parenchyma extract (CPE) and aloin on the formation of blood vessels of chicken embryos *in vivo*. The aloin (10 to 320 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and CPE (10 to 320 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) promoted pro-vasculo/angiogenic activities in the vitelline membrane (VM) of the yolk sack by 154% and 177%, respectively, and the angiogenesis in the chorioallantoic membrane (CAM) by 131% and 164%, respectively. These values are high if compared to bFGF results, used as a control (135% and 158%).

Palavras-chave: *Aloe vera*, aloína, extrato de parênquima clorofiliano, vasculogênese, angiogênese.

Introdução

O sistema cardiovascular 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, que se interconectam para formar tubos que viabilizam o fluxo do sangue e a perfusão tecidual no organismo [1]. 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 (Figura 1) [2,3].

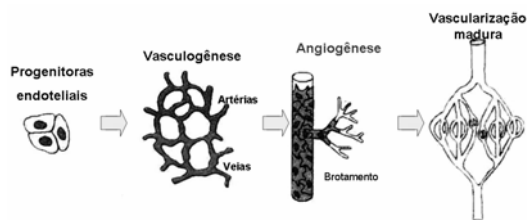


Figura 1: Processo de formação de vasos sanguíneos por vasculogênese e angiogênese. Fonte: www.roche.com.br

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) [4]. 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, que se proliferam para viabilizar o crescimento do corpo [5]. 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 [6]. No embrião, os dois processos de formação de vasos coexistem sendo que a formação de vasos sanguíneos é também mantida sob rígido controle no organismo do adulto [5,7]. A manutenção do sistema vascular é baseada na coexistência de sinais angiogênicos (ativadores) e angiostáticos (inibidores) em um equilíbrio dinâmico de concentrações estritamente controladas, mas que pode ser rapidamente estimulado ou inibido [8]. O processo de angiogênese é regulado por fatores ativadores angiogênicos, como o FGFb (*fibroblast growth factor-basic*) e VEGF (*vascular endothelial growth factor*) [9,10]. O FGFb (18 kDa) é capaz de induzir a angiogênese *in vivo*. 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 [11]. Processos angio/vasculogênicos são fundamentais para a construção de produtos médicos de engenharia de tecidos. Neste contexto, estimulantes naturais são desejáveis e sua ação precisa ser melhor compreendida.

A *Aloe vera*, também conhecida como babosa, é uma planta largamente utilizada na medicina. Dois tecidos de interesse são encontrados na folha: parênquima de reserva (PR) e parênquima clorofiliano (PC). O extrato do parênquima clorofiliano (EPC) é um líquido de consistência leitosa, coloração amarelo ocre, sabor amargo e aroma rançoso, constituído por cerca de 80 componentes como, por exemplo, os glicosídeos de antraquinonas, e aloínas A e B. A aloína é uma molécula de estrutura planar solúvel em água e é um dos principais componentes fisiologicamente ativo isolado inicialmente da babosa [12]. Algumas propriedades terapêuticas importantes, comuns aos extratos e compostos isolados da *A. vera*, particularmente as atividades antiinflamatória e antitumoral sugerem, por hipótese, que alguns desses princípios ativos sejam também moduladores eficazes da formação de vasos sanguíneos.

O presente trabalho tem como objetivo comparar os efeitos da administração da aloína e do extrato do parênquima clorofiliano (EPC) provenientes de *A. vera* sobre os processos fisiológicos de vasculogênese e angiogênese nas membranas vitelínica (MV) e corioalantóica (MC) de embriões de *Gallus domesticus*.

Materiais e Métodos

Ovos de galinha da linhagem Ross, de tamanho padrão médio (aproximadamente 55 g), foram gentilmente 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. Para avaliar a atividade da aloína e do EPC na formação de vasos sanguíneos foi utilizado primeiramente o método da vesícula vitelínica do embrião de galinha. Este método foi adaptado do ensaio da membrana corioalantóica (CAM Assay) [13,14]. Após estocagem prévia em câmara fria, os ovos foram incubados em estufa, à temperatura de 37,5°C, equipada com ventilação forçada e controle digitalizado de umidade (33%). Após 48 horas de incubação foi efetuada uma abertura de aproximadamente 10 mm na casca, possibilitando a implantação do suporte. 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 próximo ao embrião, onde ilhotas sanguíneas ainda estavam presentes. Soluções de aloína e de EPC foram absorvidas em suportes de metilcelulose e testadas nas seguintes concentrações: 10, 20, 40, 80, 100, 160, 200, 320 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Volumes de 5 μL da solução de metilcelulose, isolada ou em associação com aloína ou EPC foram pipetados em câmara de fluxo em uma bandeja de Teflon® para a polimerização dos discos. 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 [14]. Soluções de aloína e de EPC foram testadas em quatro concentrações definidas a partir dos ensaios de vasculogênese (40, 80, 160, 320 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

A avaliação quantitativa da resposta pró ou anti-vasculo/angiogênica foi realizada através da análise de imagens de regiões representativas das amostras fotografadas sob microscópio estereoscópico (20×) e posteriormente tratadas no software livre UTHSCSA Image Tool for Windows, v.3.0, baseando-se na contagem do número de vasos sanguíneos que interceptam o limite do disco de metilcelulose, como mostra a Figura 4. Todos os estudos envolvendo ovos embrionados de *G. domesticus* foram realizados de acordo com os procedimentos recomendados pelo NIH (National Institutes 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, Brasil).

Resultados

A Figura 2 mostra o número de vasos (%) em função da concentração de aloína e do EPC durante 4 dias de desenvolvimento embrionário.

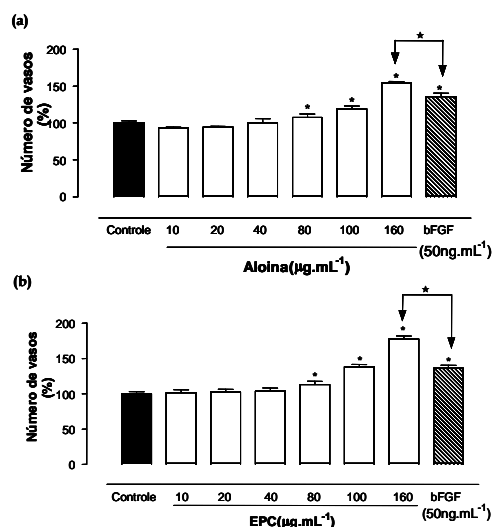


Figura 2: Número de vasos em função da concentração da aloína (a) e do extrato do parênquima clorofiliano (EPC) (b) na vasculogênese de embriões de *Gallus domesticus* com quatro dias de desenvolvimento. * Diferenças significativas ao nível de $P < 0,05$, em relação ao grupo controle (ANOVA seguido do teste Tukey).

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 (vasculogênese) em embriões [14,15]. A Figura 3 mostra o número de vasos em função da concentração da aloína e do EPC em embriões após 8 dias de desenvolvimento.

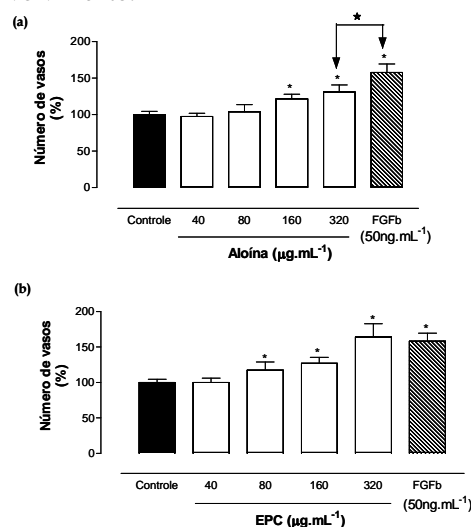


Figura 3: Número de vasos em função da concentração da aloína (a) e do extrato do parênquima clorofiliano (EPC) (b) na angiogênese de embriões de *Gallus domesticus* com oito dias de desenvolvimento.

Complementando a avaliação da porcentagem de vasos sanguíneos realizada visualmente, foram obtidas imagens fotográficas, através de microscópio estereoscópico, da membrana corioalantóica dos embriões com os respectivos tratamentos. A Figura 4 mostra as imagens obtidas experimentalmente na avaliação da formação de vasos sanguíneos na angiogênese da MC.

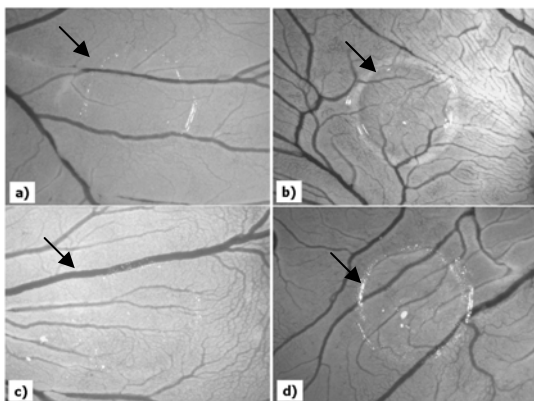


Figura 4: Fotografias da MC em microscópio estereoscópico destacando os discos de metilcelulose (setas) e os vasos sanguíneos em magenta: a) controle (veículo), b) FGFb (controle positivo, 50 ng·mL⁻¹), c) aloína (160 µg·mL⁻¹) e d) EPC (160 µg·mL⁻¹).

Discussão

Analisando a Figura 2 verifica-se que tanto a aloína como o EPC estimularam de forma dose-dependente a vasculogênese. Observa-se na Figura 2a que enquanto o grupo controle desenvolveu uma média de 108 vasos vitelínicos primários no limite dos discos (100%), os grupos tratados com aloína (80–160 µg·mL⁻¹) mostraram aumentos de 119% a 154%. É importante ressaltar que na maior concentração, de 160 µg·mL⁻¹, a aloína foi significativamente mais efetiva (154%) que o observado nos grupos tratados com fator angiogênico FGFb (50 ng·mL⁻¹, 135% de vasos). Analisando a Figura 2b verifica-se que enquanto o grupo controle desenvolveu uma média de 108 vasos vitelínicos primários no limite dos discos (100%), os grupos tratados com EPC (80–160 µg·mL⁻¹) apresentaram incrementos de 138% e 177%, respectivamente. Na concentração de 160 µg·mL⁻¹ o EPC foi significativamente mais efetivo (177%) que o FGFb (135% de vasos). Logo, o efeito do EPC foi mais significativo que o da aloína em relação ao estímulo à vasculogênese em concentrações até 100 µg·mL⁻¹; o nível de estímulo à vasculogênese ocorreu de forma dependente da concentração. Exclusivamente nas concentrações de 200 e 320 µg·mL⁻¹, ocorreu mortalidade embrionária em 100% dos casos, tanto para os grupos tratados com aloína, quanto para aqueles tratados com EPC.

Analisando a Figura 3 verifica-se que tanto a aloína como o EPC estimularam de forma dose-dependente a angiogênese. A Figura 3a mostra a porcentagem do

número de vasos em função da concentração de aloína. Enquanto o grupo controle desenvolveu uma média de 136 vasos nos limites dos discos implantados na membrana corioalantóica (100%), os grupos tratados com aloína (160 e 320 µg·mL⁻¹) mostraram aumentos de 121% e 131%, respectivamente. Além disso, a aloína na maior concentração testada, 320 µg·mL⁻¹ (131%) apresentou diferenças significativas em relação ao FGFb (158%), mas não equiparou-se ao efeito deste conhecido fator angiogênico, como ocorreu na vasculogênese.

A Figura 3b mostra a porcentagem do número de vasos em função da concentração de EPC. Observa-se que enquanto o grupo controle desenvolveu uma média de 136 vasos nos limites dos discos implantados na membrana corioalantóica (100%), os grupos tratados com EPC (160 e 320 µg·mL⁻¹) mostraram até 127% e 165% de indução, e que na concentração de 320 µg·mL⁻¹ (165%) o EPC foi mais efetivo do que o FGFb (158%). Verifica-se ainda que o efeito angiogênico do EPC foi significativo em três das quatro concentrações testadas, enquanto que nos tratamentos realizados com a aloína as respostas foram significativas em apenas duas das concentrações. Isto demonstra uma maior efetividade de indução da angiogênese do EPC em relação a aloína. É importante ressaltar que o efeito do FGFb (50 ng·mL⁻¹) foi mais pronunciado na angiogênese (158%) do que na vasculogênese (135%). Diferenças significativas em relação ao FGFb (50 ng·mL⁻¹) foram observadas quando comparados os efeitos da aloína e do EPC (160 µg·mL⁻¹) na vasculogênese, enquanto que na angiogênese observou-se diferenças em relação ao FGFb apenas para a aloína (320 µg·mL⁻¹). Esses resultados mostraram que o EPC é mais efetivo que a aloína na formação de vasos sanguíneos, tanto na vasculogênese como na angiogênese.

A Figura 4a apresenta uma amostra controle tratada com metilcelulose (veículo) e, como comparativo a Figura 4b mostra uma amostra tratada com fator de crescimento FGFb (controle positivo, 50 ng·mL⁻¹), evidenciando uma formação visualmente maior de vasos em relação ao controle. As fotografias foram tratadas e binarizadas no software UTHSCSA Image Tool, e 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 do que em relação ao controle e em relação aos grupos tratados com aloína.

Barrantes e Guinea [12], buscando esclarecer a ação bioquímica e identificar os constituintes ativos das frações de babosa, realizaram ensaios com as enzimas collagenase microbiana de *Clostridium histolyticum* e com metaloproteinases de leucócitos humanos. Esses autores extraíram da babosa uma fração rica em antraquinonas (aloína, aloesina, aloeresina, aloe emodina) e compararam seus efeitos com a aloína comercial, que foi igualmente avaliada, apresentando um efeito dose-dependente na inibição das collagenases de *C. histolyticum*. Os mecanismos de inibição da aloína sobre as metaloproteinases (MMPs) não são conhecidos; no entanto, a aloína é um composto estruturalmente

similar à tetraciclina, a qual é um conhecido inibidor de MMPs [12]. A doxíciclina, um composto quimicamente modificado da tetraciclina, exerce um potente efeito inibitório sobre as moléculas de MMPs de células de granulócitos humanos [16]. O mecanismo inibitório da doxíciclina 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. 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 podem 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 [2]. 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 [2].

Conclusão

O extrato do parênquima clorofiliano de babosa, EPC, e a aloína promoveram a vasculogênese e a angiogênese na membrana vitelínica e corioalantóica de embriões com quatro e oito dias de desenvolvimento. O EPC foi mais efetivo que a aloína em promover a vasculogênese, apresentando indução superior à do FGFb, o que sugere que algum composto ativo presente no EPC esteja agindo sinergisticamente com a aloína.

Agradecimentos

Os autores agradecem os auxílios financeiros concedidos pelo CNPq, FINEP e SEBRAE.

Referências

- [1] Tobelem, G. (1990) "Tumor Angiogenesis" *Medicine & Sciences*. v. 6. n. 5. p. 426-432.
- [2] Bouis, D., Kusumanto, Y., Meijer, C., Mulder, N.H., Hospers, G.A. (2006) "A review on pro- and anti-angiogenic factors as targets of clinical intervention" *Pharmacological Research*. v. 53. n. 2. p. 89-103.
- [3] Risau, W. (1997) "Mechanisms of angiogenesis" *Nature*. v. 386. n. 6626. p. 671-674.
- [4] Risau, W., Sariola, H., Zerwes, H.G., Sasse, J., Eklblom, P., Kemler, R., Doetschman, T. (1988) "Vasculogenesis and Angiogenesis in Embryonic-Stem-Cell-Derived Embryoid Bodies" *Development*. v. 102. n. 3. p. 471-478.
- [5] Folkman, J. (1971) "Tumor angiogenesis: therapeutic implications" *New England Journal of Medicine*. v. 285. n. 21. p. 1182-1186.
- [6] Jones, N., Iljin, K., Dumont, D.J., Alitalo, K. (2001) "Tie receptors: New modulators of angiogenic and lymphangiogenic responses" *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. v. 2. n. 4. p. 257-267.
- [7] Folkman, J., Shing, Y. (1992) "Control of angiogenesis by heparin and other sulfated polysaccharides" *Advances in Experimental Medicine Biology*. v. 313. n. p. 355-364.
- [8] Hanahan, D., Folkman, J. (1996) "Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis" *Cell*. v. 86. n. 3. p. 353-364.
- [9] Fachinger, G., Deutsch, U., Risau, W. (1999) "Functional interaction of vascular endothelial-protein-tyrosine phosphatase with the Angiopoietin receptor Tie-2" *Oncogene*. v. 18. n. 43. p. 5948-5953.
- [10] Yancopoulos, G.D., Davis, S., Gale, N.W., Rudge, J.S., Wiegand, S.J., Holash, J. (2000) "Vascular-specific growth factors and blood vessel formation" *Nature*. v. 407. n. 6801. p. 242-248.
- [11] Lockshin, R.A., Zakeri, Z. (2001) "Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory" *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. v. 2. n. 7. p. 545-550.
- [12] Barrantes, E., M. Guinea. (2003) "Inhibition of collagenase and metalloproteinases by aloins and aloe gel" *Life Sciences*. v. 72. n. 7. p. 843-850.
- [13] Dias, P.F., Siqueira-Junior, J.M., Vendrusco, L.F., Neiva, T.J., Maraschin, M., Gagliardi, A., Ribeiro-Do-Valle, R.M. (2005) "Antiangiogenic and antitumoral properties of polysaccharide isolated from the seaweed *Sargassum stenophyllum*" *Cancer Chemotherapy Pharmacology*. v. 5. n. 7. p. 57-69.
- [14] Nguyen, M., Shing, Y., Folkman, J. (1994) "Quantitation of Angiogenesis and Antiangiogenesis in the Chick-Embryo Chorioallantoic Membrane" *Microvascular Research*. v. 47. n. 1. p. 31-40.
- [15] Iruela-Arispe, M.L., Lane, T.F., Redmond, D., Reilly, M., Bolender, R.P., Kavanagh, T.J., Sage, E.H. (1995) "Expression of SPARC during development of the chicken chorioallantoic membrane: evidence for regulated proteolysis in vivo" *Molecular Biology of the Cell*. v. 6. n. 3. p. 327-343.
- [16] Greenwald, R.A., L. M. Golub, N. S. Ramamurthy, M. Chowdhury, S. A. Moak, T. Sorsa. (1998) "In vitro sensitivity of the three mammalian collagenases to tetracycline inhibition: relationship to bone and cartilage degradation." *Bone*. v. 22. n. 1. p. 33-38.