

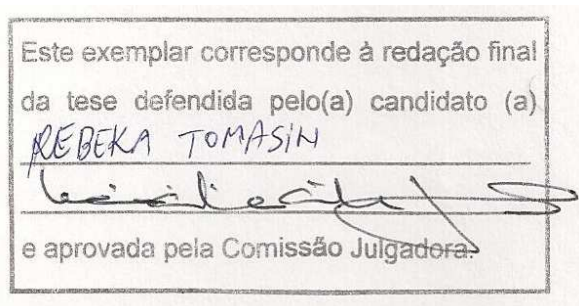
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



REBEKA TOMASIN

**“EFEITOS TERAPÊUTICOS DO HOMOGENEIZADO DE *Aloe vera*
E MEL SOBRE O CRESCIMENTO E ATIVIDADE CELULAR DO
CARCINOSSARCOMA DE WALKER 256”**



Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Biologia Funcional e Molecular, na área de Fisiologia.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes

Campinas, 2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

T591e	<p>Tomasin, Rebeka</p> <p>Efeitos terapêuticos do homogeneizado de <i>Aloe Vera</i> e mel sobre o crescimento e atividade celular do carcinossarcoma de Walker 256 / Rebeka Tomasin. – Campinas, SP: [s.n.], 2010.</p> <p>Orientadora: Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. <i>Aloe vera</i>. 2. Mel. 3. Câncer. 4. Estresse oxidativo. 5. Apoptose. I. Gomes-Marcondes, Maria Cristina Cintra, 1961-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p> <p align="right">(rcdt/ib)</p>
--------------	---

Título em inglês: Effects of *Aloe vera* and honey on tumor growth evolution in rats.

Palavras-chave em inglês: *Aloe Vera*; Honey; Cancer; Oxidative stress; Apoptosis.

Área de concentração: Fisiologia.

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes, Miguel Arcanjo Areas, Felix Guillermo Reyes Reyes.

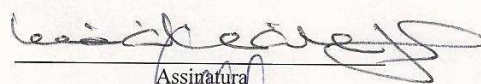
Data da defesa: 25/02/2010.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 25 de fevereiro de 2010

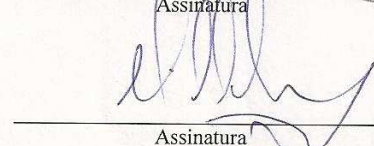
BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes
(Orientadora)



Assinatura

Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas



Assinatura

Prof. Dr. Felix Guillermo Reyes Reyes



Assinatura

Profa. Dra. Dora Maria Grassi Kassis

Assinatura

Profa. Dra. Maria Alice Rostom de Mello

Assinatura

Dedicatória

Para Rodrigo Calvi e Victor Quaglio Paulelli. Quem me dera pudesse fazê-los ver o mundo pelos meus olhos, ouvir o barulho das ondas através dos meus ouvidos, sentir o cheiro da chuva através do meu olfato, provar os mais deliciosos sabores pelo meu paladar, sentir o calor dos abraços pelo meu tato... Já que isso eu jamais poderei fazer, que meu trabalho então possibilite a mais pessoas ver, ouvir, tocar, sentir perfumes e sabores por mais tempo, e que assim eu faça jus à segunda chance que eu tive, às pessoas incríveis que eu pude conhecer e ao convívio com os que me rodeiam.

Agradecimentos

À minha super-família: meus pais Ana e Geraldo, que por acreditarem tanto em mim me fazem ser melhor. Obrigada por me mostrarem o que é amor incondicional... Meu “irmãozinho” Samuel – o homem mais lindo do mundo – obrigada por ser este farol na minha vida, que mesmo a quilômetros me guia e protege... Minha irmã Fabíola – meu orgulho – obrigada por, além de fazer qualquer coisa por mim, me inspirar a fazer qualquer coisa... Isso é o melhor da vida: o melhor da minha vida são vocês!!!

Aos meus primos Raissa, Mariah, Mariana, Felipe, Paulinho e Ronaldo por protagonizarem comigo e com meus irmãos muitos dos melhores momentos das nossas vidas, por chorarmos de tanto rir e principalmente por, apesar de termos crescido, mantermos o mesmo laço de amor desde quando éramos bebês.

Aos meus tios Ivone e Claret, e meus primos Juliana, Marcelo e Simone, por sempre me socorrerem quando eu tinha que mandar ou pegar coisas da internet e pelos bons momentos que passamos juntos nas festas de família.

Aos amigos que ficaram depois que a faculdade passou: Luciana, Rodrigo, Aline e Patrícia. Luciana - a Diva – obrigada por ser a pessoa que melhor me entende, e muitas vezes a primeira e única pessoa com que eu gostaria de falar. Rods, valeu por todos os dias de almoço/conversa no RA e por de alguma maneira me fazer saber que sempre posso contar com você. Aline, obrigada por me incluir no grupo de sortudos que contam com a alegria, energia e felicidade contagiantes que emanam de você. Patrícia, o “twix” (Chocolate, Caramelo e Biscoito = Luciana, Rebeka e Patrícia) só poderia existir com você – obrigada por ter voltado!

Aos meus amigos dessa vida suada, dolorida e de luta – os judocas! Sorte a minha um dia ter vestido o kimono e, apesar de tudo, nunca ter tirado, pois onde mais eu encontraria Feijões, Danilos, Higas, Dris, Priscilas, etc se não fosse no tatame? Ah, Diego, obrigada por ser o sensei mais bonzinho da face da Terra!

À Amanda e sua família, por compartilharem comigo uma década de amizade onde quase tudo aconteceu!

Aos voluntários, mas especialmente aos pacientes do Boldrini, por reforçarem na minha mente o que de fato é um problema, e pelo que eu estou pesquisando.

À minha orientadora, psicóloga, biblioteca e “mãe laboratorial”, Profa. Dra. Maria Cristina. Obrigada por ser estonteantemente ágil e por fazer tudo do laboratório muito melhor do que qualquer um de nós. E ah, desculpe por te “atropelar” de vez em quando – afinal de contas, se eu sou rápida foi por que aprendi com a Mestra!

A todos com quem eu compartilho, muito além do espaço físico do laboratório, a vivência científica: Tatiane, André, Emilianne, Gisele, Estela, Aline, Laís e Priscila. Todos vocês me ajudam muito mais do que imaginam... Aline, obrigada por me ensinar que “corajoso não é aquele que não sente medo, e sim aquele que mesmo com medo, não deixa de fazer”.

Ao Prof. Dr. Hernandes Carvalho e ao pessoal de seu laboratório (Danilo, Taize e Rony) por me ensinarem o melhor protocolo de imunohistoquímica que eu já vi!

À Fabrícia e ao Juvani, sempre me socorrendo com a histologia... E Juvani, como você é divertido!

À Larissa, aluna da profa. Dora – sempre tão legal, aberta e cooperativa – o mundo seria muito melhor se mais pessoas tivessem a sua conduta.

Aos alunos do primeiro ano de Medicina Unicamp/09 – os meus “embriões de médicos”. Foi estudando e ministrando aulas para vocês que eu me dei conta, de vez, que eu gosto e sou capaz de dar aulas até para as melhores turmas.

“Gyuton ----- R\$ 250,00

Berne -----R\$ 270,00

Palmas e “Rê, a gente te ama” de mais de 100 alunos da Med: Não tem preço!”

Algumas meninas das “repúblicas que passei” com as quais compartilhei bons momentos: Tati (inércia), Marcela (conversas até altas horas), Germanna (“Somebody save me”), Bia (House MD), Raquel (concertos de violino vips) e Helô (karaokê).

À Gabi, Rony, Bruna, Elga, e mais um bocado de gente – suficiente para lotar o ônibus Limeira-Campinas... a viagem é sempre melhor e mais divertida com vocês ao meu lado

À FAPESP, FAEPEX, CAPES e CNPq pelo suporte financeiro.

Questions of science, science and progress
Do not speak as loud as my heart.
Coldplay – The Scientist

*“Ame como se ninguém nunca o houvesse feito sofrer,
Trabalhe como se não precisasse do dinheiro,
Dance como se ninguém estivesse olhando,
Soria como se não existissem lágrimas,
Cante como se ninguém estivesse ouvindo,
Brinque como se não tivesse crescido,
Viva como se aqui fosse o Paraíso”*
(Autor desconhecido)

LISTA DE ABREVIATURAS

AC1: Controle-*Aloe vera* e mel (experimento 1)

AC2: Controle-*Aloe vera* e mel (experimento 2)

AW2: *Aloe vera* e mel-Tumor (experimento 2)

AWA2: *Aloe vera* e mel-Tumor-*Aloe vera* e mel (experimento 2)

CC1: Controle-Salina (experimento 1)

CC2: Controle-Salina (experimento 2)

CW1: Tumor-Salina (experimento 1)

CW2: Tumor-Salina (experimento 2)

CWA2: Tumor-*Aloe vera* e mel (experimento 2)

WA1: Tumor-*Aloe vera* e mel (experimento 1)

CRH: Hormônio Liberador de Corticotrofina

GST: Glutathione-S-Transferase

Ki67 LI: Ki-67 labelling index

MDA: Malondialdeído

OMS: Organização Mundial da Saúde

PIF: Fator de Indução de Proteólise

SOD: Superoxido Dismutase

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral alfa

VEGF: Fator de Crescimento do Endotélio Vascular

SUMÁRIO:

1. RESUMO	10
2. ABSTRACT.....	11
3. INTRODUÇÃO.....	12
4. JUSTIFICATIVA	13
5. SINTESE DA BIBLIOGRAFIA FUNDAMENTAL	14
5.1 - CÂNCER.....	14
5.2 - <i>ALOE VERA</i>	19
5.3 - MEL.....	23
5.4 - CARCINOSSARCOMA DE WALKER 256 E MODELO ANIMAL	26
6 - OBJETIVOS.....	27
6.1 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	27
7 - MATERIAIS E MÉTODOS	28
7.1 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	28
7.1.1 - Preparo do homogeneizado de <i>Aloe vera</i> e mel:.....	28
7.1.2 - Experimento 1: Ação de <i>Aloe vera</i> e Mel Sobre a Proliferação Celular e Apoptose:	28
7.1.3 - Experimento 2: Avaliação da Eficácia Terapêutica do Homogeneizado de <i>Aloe vera</i> e mel:.....	30
7.2 - ANÁLISES DO MATERIAL COLETADO	31
7.2.1 - Análise do estresse oxidativo: Atividade Enzimática tecidual	31
7.2.2 - Composição Corpórea	33
7.2.3 - Imunohistoquímica	33
7.2.4 - Dosagens séricas:	34
7.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
8. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
8.1 - EXPERIMENTO 1 - PROLIFERAÇÃO CELULAR E APOPTOSE:	35
8.2 - EXPERIMENTO 2: AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA TERAPÊUTICA DO HOMOGENEIZADO DE <i>ALOE VERA</i> E MEL: ..	52
8.2.1 - Ingestão e Ganho de Peso:	52
8.2.2 - Análises Morfométricas:	55
8.2.3 - Composição corpórea:	65
8.2.4 - Análises Bioquímicas Séricas:	67
8.2.5 - Avaliação da Atividade Celular, Estresse Oxidativo e Enzimas Antioxidantes:	71
9 – CONCLUSÕES	94
10 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:	95
11 – ANEXOS:.....	112

1. RESUMO

O câncer é responsável pela morte de oito milhões de pessoas todos os anos, sendo que anualmente são diagnosticados mais de onze milhões de novos casos. O estudo de tratamentos alternativos e coadjuvantes é, portanto, de grande valia. Aventa-se que tanto *Aloe vera* quanto o mel contém efeitos anti-câncer. O objetivo deste trabalho foi verificar a ação do homogeneizado de *Aloe vera* e mel sobre o crescimento tumoral e caquexia em ratos Wistar portadores de carcinossarcoma de Walker 256. Visando avaliar o impacto da administração de *Aloe vera* e mel sobre a proliferação celular e apoptose no decorrer do desenvolvimento tumoral, foram coletados tecido hepático e tumoral de animais sacrificados após 7, 14 e 20 dias de implantação tumoral. As análises imunohistoquímicas de tumores provenientes de animais tratados com homogeneizado de *Aloe vera* e mel revelaram, ao longo do desenvolvimento tumoral, queda na taxa de proliferação celular (Ki-67) e aumento na susceptibilidade à apoptose (relação Bax/Bcl-2) além de menor peso relativo do tumor, quando comparados aos tumores de animais que receberam soro fisiológico. Paralelamente, a análise do tecido hepático desses animais mostrou queda na susceptibilidade à apoptose (relação Bax/Bcl-2) em relação aos animais que não foram tratados com *Aloe vera* e mel. A fim de se avaliar o efeito terapêutico do homogeneizado de *Aloe vera* e mel sobre parâmetros relacionados ao estresse oxidativo e à caquexia, ratos Wistar tratados ou não anteriormente à indução tumoral foram redistribuídos de forma a iniciar (CWA), interromper (AW), manter (AWA) ou não receber tratamento (CW) com *Aloe vera* e mel após a indução de tumor. Os animais foram monitorados quanto ao ganho de peso, consumo de dieta e peso calculado do tumor. Após 21 dias de evolução tumoral, as análises morfométricas associadas à quantificação de proteínas séricas, bem como avaliação de estresse oxidativo (envolvendo análise da atividade de catalase, superóxido dismutase, glutathione S transferase e fosfatase alcalina, além do teor de proteína e MDA), em órgãos como fígado, músculo e coração, sugerem que o tratamento com homogeneizado de *Aloe vera* e mel auxiliou na modulação do estresse oxidativo, espoliação e caquexia, especialmente quando administrado de forma terapêutica (CWA). Em contrapartida, foi observada tendência a estresse oxidativo bem como queda na atividade de enzimas antioxidantes no tecido tumoral, em animais tratados com *Aloe vera* e mel. Os dados obtidos sugerem que a administração de *Aloe vera* e mel preserva a integridade dos tecidos hospedeiros enquanto provoca detrimento do tecido tumoral.

2. ABSTRACT

Cancer is diagnosed in approximately 11 million people and is responsible for approximately 8 million deaths every year. Research in cancer control has shown the importance of co-adjuvant therapies. *Aloe vera* may reduce tumour mass and metastasis rates, while honey may inhibit tumour growth. This study verified the influence of *Aloe vera* and honey on tumour growth and cachexia in tumour-bearing rats. The influence of *Aloe vera* and honey on tumour growth evolution was assessed through tumour cell proliferation rate (Ki67-LI) and Bax/Bcl-2 ratio at 7, 14 and 20 days after the implant of Walker 256 carcinoma (sc) in adult rats. The effect of *Aloe vera* and honey against tumour growth was observed through a decrease in tumour cell proliferative rates and an increase in apoptosis susceptibility (Bax/Bcl-2 ratio) in tumours of treated group compared to untreated group. In contrast, it was observed a decrease in apoptosis susceptibility (Bax/Bcl-2 ratio) in livers of *Aloe vera* and honey-treated group, showing a possible protective effect in liver tissue. In order to elucidate the therapeutic effects of *Aloe vera* and honey solution on oxidative stress and cachexia development, *Aloe vera* and honey-treated and untreated rats before tumour induction were distributed into the following groups: tumour-bearing rats treated after tumour implant (CWA), treated before tumour implant (AW), treated before and after tumour implant (AWA) with *Aloe vera* and honey solution and untreated tumour-bearing rats (CW). After 21 days of tumour implant, morphometric analyses, serum proteins content and oxidative stress assays (catalase, superoxide dismutase, glutathione-S-transferase, alkaline phosphatase activities and protein and MDA content) were evaluated in liver, muscle and myocardium. The *Aloe vera* and honey treatment modulated oxidative stress, tissue wasting and cachexia, especially as therapeutic way (CWA). On the other hand, tumour of *Aloe vera* and honey-treated rats tended to increase oxidative stress and/or decrease antioxidant enzymes activities. These data suggested *Aloe vera* and honey treatment affected tumour and host in a different way, by preserving host tissues while promoted damages in tumour tissue.

3. INTRODUÇÃO

O câncer é segunda causa morte, dentre as diversas patologias e é responsável pela morte de oito milhões de pessoas todos os anos, o que corresponde a 12,5% do total de mortes no mundo. Anualmente são diagnosticados mais de onze milhões novos casos (OMS). Além das terapias convencionais como quimioterapia, radioterapia e cirurgia, atualmente tem se investido muito em terapias coadjuvantes na tentativa de melhorar ainda mais o prognóstico da doença e a qualidade de vida do paciente.

Assim, muito utilizada na medicina popular, a *Aloe vera* (também denominada *Aloe barbadensis* Miller), conhecida como babosa, é uma planta perene pertencente à família *Liliaceae*, tribo *Aloineae*, que inclui cerca de 420 espécies (BOUDREAU & BELAND, 2006), contém varias propriedades terapêuticas importantes, incluindo prováveis efeitos anticâncer. Avaliações clínicas têm revelado que os ingredientes farmacologicamente ativos estão concentrados tanto no gel, quanto na casca da folha de *Aloe vera* (RAJASEKARAN *et al.*, 2005).

Paralelamente, o mel também é muito utilizado na medicina popular, embora alguns afirmem que ele seja comparado ao açúcar em seus valores nutritivos e que proteínas, minerais e vitaminas estão em baixa quantidade, tendo portanto pouca importância nutricional (HEITKAMP & BUSCH-STOCKFISCH, 1986). Porém, há evidências de que o mel seja um agente moderador anti-tumor, com relevantes efeitos anti-metástase (GRIBEL' & PASHINSKII, 1990).

Os estudos *in vivo* utilizando organismos-modelo têm sido essenciais para compreensão do comportamento de inúmeras doenças, possibilitando ainda a observação do desenvolvimento patológico e reação corporal frente a diferentes intervenções e novos tratamentos, oferecendo assim resultados preliminares mais seguros antes de testes em seres humanos.

4. JUSTIFICATIVA

Embora seja muito utilizado na medicina popular no combate ao câncer, não há nenhuma comprovação científica de que o extrato da folha de *Aloe vera* junto ao mel exerça real atividade anti-tumoral ou traga algum tipo de benefício ao indivíduo com câncer.

Devido à importância global do câncer, à facilidade de obtenção de *Aloe vera* e mel e simples preparo do homogeneizado, é de suma importância conhecer a veracidade de seus efeitos.

5. SINTESE DA BIBLIOGRAFIA FUNDAMENTAL

5.1 - Câncer

O câncer, também conhecido como neoplasia ou tumor, é um tecido que cresce ativamente devido à proliferação de células, derivadas de uma que sofreu diferenciação anormal irreversível, sendo que o mecanismo controle do crescimento deste tecido está alterado, permanentemente, permitindo assim um crescimento progressivo.

A maioria dos cânceres em humanos resulta de mutações esporádicas em genes supressores de tumor, em células de origem ectodérmica ou endodérmica – denominados carcinomas e adenocarcinomas, e mesodérmica – denominados sarcomas (HERZIG & CHRISTOFORI 2002). Eventos críticos na evolução da neoplasia incluem: (a) perda do controle proliferativo (as células cancerosas produzem seus próprios fatores de crescimento de maneira exagerada), (b) falha e/ou inibição no processo de morte celular programada - apoptose -(processo altamente regulado que envolve a ruptura de membranas celulares, fragmentação do núcleo, degradação do DNA e quebra do citoesqueleto), (c) início de neoangiogênese (essencial para a manutenção e crescimento do tumor, e posteriormente facilitação do processo de metástase), (d) remodelamento tecidual (que necessita da degradação da matriz extracelular), (e) invasão das células tumorais nos tecidos adjacentes, com a aquisição de mobilidade celular, e finalmente (f) a dispersão dessas células pelo sangue até órgãos e tecidos distantes, onde ocorre a adesão seguida da formação de metástases. As metástases causam cerca de 90% das mortes por câncer em humanos.

A fim de permitir o surgimento, manutenção e evolução tumoral, são necessárias alterações nos padrões de ciclo/morte celular e no metabolismo da célula, uma vez que elevação na demanda energética, na captura e biossíntese de nutrientes são premissas necessárias ao crescimento e proliferação celular (DEBERARDINIS *et al.*, 2008; JONES & THOMPSON, 2009).

Warburg *et al* (1924) demonstraram que a metabolização de glicose por células tumorais é anormalmente rápida e elevada, e que a glicose era preferencialmente convertida a lactato ao invés de entrar na cadeia de fosforilação oxidativa mitocondrial, mesmo na presença de oxigênio. Foi proposto que este processo, devido principalmente a disfunções mitocondriais, poderia ser a chave do desenvolvimento do câncer (WARBURG *et al.*, 1924; WARBURG 1956a, 1956b).

Outras pesquisas constataram que lesões gênicas que levam tanto à ativação de oncogenes quanto à inativação de genes supressores de tumor conduzem à progressão do câncer através de alterações no ciclo celular e no padrão apoptótico (ARENDS *et al.*, 1944; GRAÑA & REDDY, 1995; KING & CIDLOWSKI, 1995; WYLLIE, 1997; HANAHAN & WEINBERG, 2000; LETAI, 2008).

O crescimento anormalmente acelerado dos tumores é atribuído tanto à perda de restrição da proliferação celular quanto à falha nos mecanismos de apoptose, tornando o processo de morte celular insuficiente para a contenção da patologia (NICHOLSON, 2000).

A proteína nuclear Ki-67 está expressa durante todas as fases do ciclo celular relacionadas ao processo de divisão (G1, S, G2, e mitose), porém está ausente durante a quiescência (G0). Esta característica faz com que a proteína Ki-67 seja um dos melhores e mais utilizados marcadores de proliferação celular para determinação da “fração em crescimento” de um determinado grupo de células. Diversos estudos demonstraram que, em determinados tipos de tumor, como mama e próstata, o índice de marcação por Ki-67 pareceu ser um poderoso indicador do prognóstico para sobrevida e recidiva tumoral (SCHOLZEN & GERDES, 2000).

A sobrevivência celular depende da complexa relação entre proteínas pró e anti-apoptóticas. Exercendo papel fundamental nesse processo, tem-se as proteínas da família da Bcl-2, entre elas a Bax (pró-apoptótica) e a própria Bcl-2 (anti-apoptótica) (NICHOLSON, 2000; BRÖKER *et al.*, 2005; DAI & GRANT, 2007; ADAMS & CORY, 2007).

Existem evidências de que polimorfismos nos genes para Bax e Bcl-2, que diminuem a tendência a apoptose, resultem em falha na eliminação células com danos no DNA, aumentando assim a chance de preservar clones mutados e consequentemente o risco de manifestação de tumor (CAMPLEJOHN *et al.* 2003; IMYANITOV *et al.* 2005, NÜCKEL *et al.* 2007; MAJID *et al.* 2008; SAXENA *et al.* 2002; STARCZYNSKI *et al.* 2005, EVGENY & IMYANITOV, 2009).

Na presença de estímulos pró-apoptóticos (como dano ao DNA, por exemplo), monômeros da proteína Bax solubilizados no citoplasma, sofrem ativação e translocação para a mitocôndria, onde formam homooligomêros capazes de provocar permeabilização da membrana mitocondrial externa, permitindo a passagem de água e pequenas moléculas, com consequente aumento da distância intermembranas seguida pela ruptura da membrana mitocondrial externa (BRÖKER *et al.*, 2005; DAI & GRANT, 2007). Todo o processo leva à liberação de proteínas, entre elas o citocromo C, que no citoplasma se associa à Apaf-1 e à pró-caspase 9 na presença de ATP, em uma estrutura denominada "apoptosomo", desencadeando, por ativação da caspase 9, a cascata clássica da apoptose que resulta na morte celular (BRÖKER *et al.*, 2005; DAI & GRANT, 2007).

A ação anti-apoptótica da Bcl-2 ocorre devido à heterodimerização com Bax, impedindo sua ativação e consequente progressão da cascata apoptótica (ADAMS & CORY, 2007).

Pesquisas mais recentes tem demonstrado que muitos dos genes bem estabelecidos como oncogenes (entre eles, c-Myc, H-ras, src e Akt), bem como genes supressores de tumor (entre eles, p53), estão relacionados ao controle do metabolismo das células tumorais (DANG & SEMENZA 1999; VOGELSTEIN *et al.* 2000; VOGELSTEIN & KINZLER, 2004, ELSTROM *et al.* 2004, LEE *et al.* 2007; BUZZAI *et al.* 2007; BUDANOV & KARIN 2008).

Ryan *et al.* (2007) apontaram que durante o desenvolvimento do tumor, ocorre a mobilização de reservas dos tecidos hospedeiros para o tecido tumoral através de uma série de mecanismos que levam ao quadro de fadiga relacionada ao câncer. Entre esses mecanismos está a caquexia, que

consiste na perda de tecido adiposo e massa muscular esquelética ligado à anorexia, perda de peso, fadiga e redução do tempo de sobrevivência. Aproximadamente 50% do total de pacientes com câncer são afetados pela caquexia. Este valor sobe para 85% para certos tipos de câncer, tais como gástrico e pancreático (DE WYS *et al.*, 1980; TISDALE, 1999, 2009a). A etiologia da caquexia-câncer é complexa e envolve não apenas a redução da reserva de nutrientes, mas também alterações metabólicas induzidas pelo tumor (REBECA *et al.*, 2008), incluindo redução na síntese de proteínas no músculo esquelético e catabolismo protéico. Este catabolismo tecidual é mediado pelas citocinas TNF- α e IL-6 (TISDALE 1997, 2005, 2008, 2009a, 2009b; ARGILES *et al.*, 2006) e por produtos catabólicos do tumor, tais como o fator de mobilização de lipídios e o fator de indução de proteólise - PIF (TISDALE, 1997, 2008, 2009a, 2009b). Citocinas pró-inflamatórias também podem induzir a liberação de CRH, que tem poderoso efeito anorexígeno (CONNAN *et al.*, 2007).

O desenvolvimento de vasos sanguíneos em quantidade suficiente para suprir a alta demanda por oxigênio e nutrientes requerida pelo tumor, é essencial tanto para o crescimento quanto para a ocorrência de metástase em tumores sólidos (FURUYA *et al.*, 2009; DE PAEPE, 2009). O processo de angiogênese, durante a evolução do câncer, consiste no desenvolvimento de novos vasos sanguíneos a partir de vasculatura pré-existente. A regulação deste processo é complexa e depende de interações entre as células tumorais e componentes do estroma, ambos capazes de liberar fatores que influenciam o processo angiogênico, entre eles, o VEGF (GRIMM *et al.*, 2009; DE PAEPE, 2009). Acredita-se que, futuramente, terapias anti-angiogênicas, incorporadas à quimioterapia, estarão entre as principais formas de tratamento do câncer (ZICHE *et al.*, 2004; ORGAZ, *et al.*, 2008).

Durante a progressão de carcinomas invasivos, as células sofrem alterações morfogenéticas, em um processo denominado “transição epitélio-mesenchimal” (EMT), geralmente associado a alterações nas proteínas de adesão (troca de E-caderinas por N-caderinas), aquisição de morfologia displásica e aumento da motilidade (formação de invadopódios, prolongamentos celulares ricos em actina, com

grande atividade proteolítica, capazes de aderir, degradar e invadir a matriz extracelular). Esses eventos culminam em perda de aderência e remodelamento da matriz extracelular, sendo este associado à ação de metaloproteases (MMPs), secretadas pela célula tumoral, especialmente nas regiões dos invadopódios (HALL, 2009; YILMAZ & CHRISTOFORI, 2009).

Paralelamente, um dos mecanismos que possibilita o desenvolvimento tumoral é a capacidade de realizar “escape imunológico”, devido à baixa imunogenicidade do tumor (WILLIMSKY & BLANKENSTEIN, 2005; PEGGS *et al.*, 2009). No entanto, já foi demonstrado que a presença de células dendríticas plasmocitóides, secretando Interferon- γ , é capaz de desencadear a resposta imune inata, via células *Natural Killer*, que indiretamente desencadeiam a resposta imune adquirida, via linfócitos T citotóxicos (CD4⁺ e CD8⁺). O ataque imune gerado provoca diminuição do crescimento tumoral em modelo murino implantado com melanoma B16 (LIU *et al.*, 2008).

A partir da complexa ocorrência dos processos citados, necessários à carcinogênese e ao desenvolvimento tumoral, têm-se o surgimento e a progressão de tumores heterogêneos, constituídos por células muitas vezes com características diferenciadas dentro do próprio tumor (Figura 1).

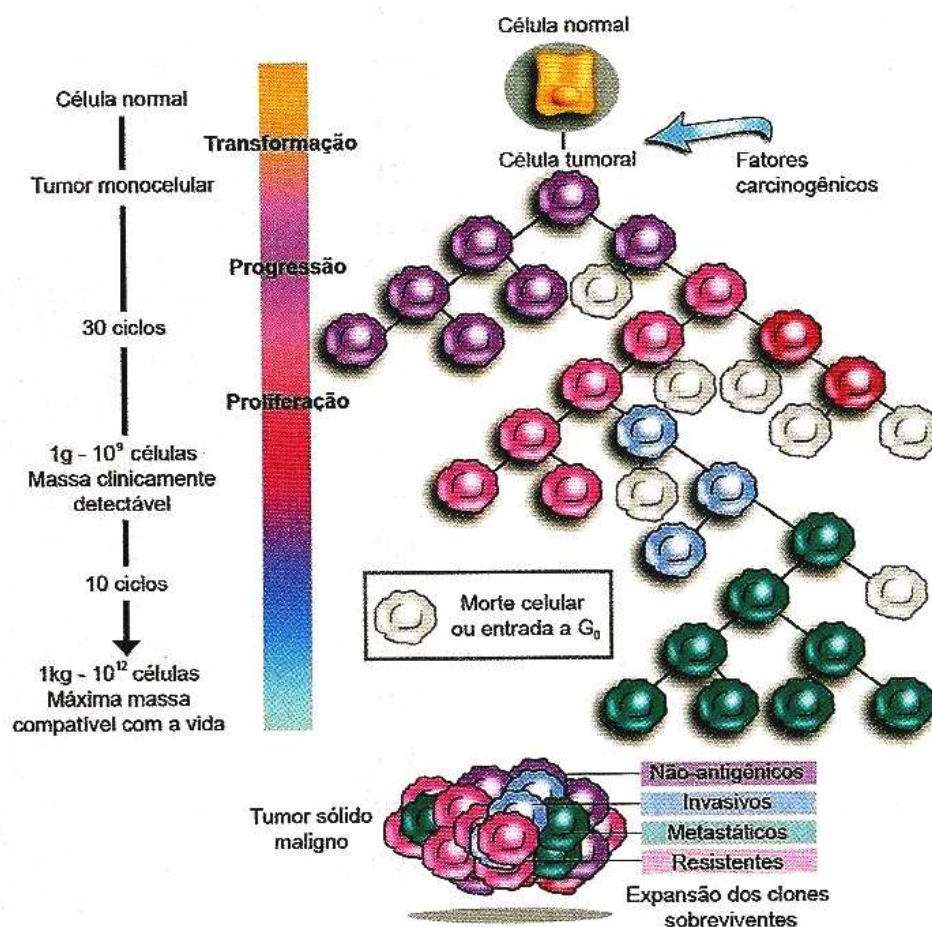


Figura 1. Carcinogênese e Desenvolvimento Tumoral. Fonte: Fernandes Júnior *et al.* (coord.), 2010.

5.2 - *Aloe vera*

Atualmente, o uso de produtos de origem natural, não industrializados e alternativos à terapia convencional (alopatia) tem crescido. A *Aloe vera* tem sido estudada pelas suas propriedades medicinais e é muito utilizada pela medicina alternativa. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a *Aloe vera*, conhecida popularmente como babosa, é amplamente utilizada em tratamentos cutâneos externos, porém há poucos estudos sobre suas propriedades anti-neoplásicas.

Estudos que analisaram a composição da *Aloe vera* indicam que o parênquima de sua folha contém polissacarídeos ricos em galactose, ácido galacturônico (encontrado na parede celular em proporção anormalmente elevada), ácido pécico, mananas, entre outros (GRINDLAY &

REYNOLDS, 1986; CHOI & CHUNG, 2003 e NI *et al.*, 2004) (Tabela 1). Porém, ainda não se conhece bem a correlação entre todos os componentes e os efeitos fisiológicos provocados pela *Aloe vera*.

Tabela 1. Principais componentes de *Aloe vera*:

Grupo	Componentes
Antraquinonas	aloe-emodina, ácido aloético, aloina, antranol, barbaloina, isobarbaloina, emodina, ester de ácido cinâmico.
Sacarídeos	celulose, glicose, manose, aldopentose, manana acetilada (<i>acemannan</i>), glicomanana, glicomanana acetilada, galactogalacturana, glicogalactomanana, galactoglicoarabinomanana.
Vitaminas	B1, B2, B6, C, β -caroteno, colina, ácido fólico, α -tocoferol.
Enzimas	Amilase, carboxipeptidase, catalase, ciclooxidase, lipase, oxidase.
Substâncias de baixo peso molecular	Acido araquidônico, giberelina, lectinas, ligninas, ácido salicílico, β -sitosterol, esteróides, triglicérides, ácido úrico.

Fonte: CHOI & CHUNG, 2003 pag. 57

Os experimentos de Ikeno *et al.* (2002) indicaram que a administração oral de *Aloe vera* ao longo de toda a vida, em modelo de ratos Fisher 344 machos, não apresentou traços de toxicidade, nem tampouco efeitos prejudiciais ou deletérios, mas sim mostra que poderia ser capaz de prevenir doenças ligadas à idade.

Singh *et al.* (2000) observaram possível ação antioxidante da *Aloe vera*, protegendo contra a indução de pró-oxidação de membrana e dano celular, comandando nos órgãos a detoxificação de metabólitos reativos, incluindo carcinogênicos e drogas.

Os estudos de Rajasekaran *et al.* (2005) mostraram que a *Aloe vera*, através da administração intragástrica de seu extrato alcoólico, também ajuda a baixar os níveis de hemoglobina glicosilada, o que sugere melhora no quadro de estresse oxidativo devido a hiperglicemia.

Pesquisas *in vivo* desenvolvidas por Gribel' & Pashinskii (1986) mostraram importantes resultados à cerca do combate ao câncer pelo uso de *Aloe vera*, como redução da massa tumoral, dos focos e da frequência de metástases, além de potencializar os efeitos anti-tumor de componentes da combinação quimioterápica (5-fluoracil e ciclofosfamida).

Embora os efeitos anti-tumorais dos extratos de *Aloe vera* sejam geralmente atribuídos à polimannana acetilada (*acemannan*), à aloe emodina, e à fração glicoprotéica em geral, estudos demonstram que esses efeitos também são gerados por outras substâncias presentes na folha (Tabela 2), como outros polissacarídeos, emodina, dietilhexilftalato, lectinas entre outros (REYNOLDS & DWECK, 1999; CHOI & CHUNG, 2003; AKEV *et. al.*, 2007).

Tabela 2. Atividades Farmacológicas Atribuídas aos Componentes da *Aloe vera*

Componente	Atividades Farmacológicas Atribuídas
Glicoproteínas	Cicatrização, promoção de proliferação celular, antialérgica
Barbaloina	Purgativa
Aloe-emodina, Emodina	Purgativa, promoção de proliferação celular, anticancerígena, anti protozoários/bactérias, antioxidante
Manose-6-fosfato	Cicatrização, antiinflamação
Polissacarídeos	Anticâncer, imunomodulação
Acemannan	Imunomodulação, antimicrobiológica, antitumoral, anticancerígeno
Aloesina	Promoção de proliferação celular, inibição da síntese de melatonina
β-sitosterol	Antiinflamação, promoção de angiogênese
Dietilhexilftalato	Anticâncer
Substâncias de baixo peso molecular (0,5~1kD)	Imunomodulação

Fonte: CHOI & CHUNG, 2003 pag. 57

Reynolds & Dweck (1999) expuseram que várias propriedades imunomoduladoras estão atribuídas ao *acemannan* da *Aloe vera* (atualmente essa substância está coberta por várias patentes).

De acordo com Fogleman *et al.* (1992), o *acemannan* consiste em longa cadeia polidispersa beta-(1,4)-acetilada polimannose, dotada de grupos O-acetil com um monômero de manose ou acetil,

espalhados na proporção de aproximadamente 1:1 (Figura 2), e seria apontado como estimulador imunológico, quando administrado *in vivo* via injeção intravenosa ou intraperitoneal.

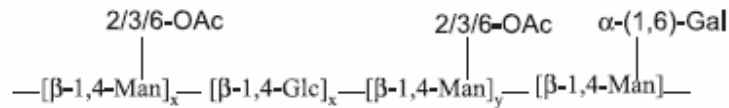


Figura 2. Estrutura molecular do Acemannan. Fonte: TALMADGEA *et al.*, 2004. Ac = acetil, Gal = galactose, Man = manana, Glc = Glicose.

Peng *et al.* (1991) demonstraram que camundongos portadores de sarcoma tratados com *acemannan* apresentaram regressão do tumor, provavelmente devido à atuação do sistema imunológico. Experimentos de Merriam *et al.* (1996) mostraram que o tratamento com *acemannan* anteriormente à indução de sarcoma em camundongos inibiu o seu desenvolvimento diminuindo a mortalidade em cerca de 40%.

Observações clínicas de animais tratados com *acemannan* sugerem que sarcomas de tecidos moles inicialmente aumentam de tamanho, mas que isso é seguido por encapsulação fibrosa, invasão por linfócitos e necrose do tumor (HARRIS *et al.*, 1991).

Lee *et al.*, (2001) demonstraram que o *acemannan* é capaz de induzir a maturação de células dendríticas *in vitro*, sugerindo ainda que a maturação dessas células ativaria o sistema imune inato, importante, entre outros, para o combate a tumores.

A ação da antraquinona aloe emodina (Figura 3) é controversa. Existem estudos que apontam para a ação desta substância na promoção de apoptose e inibição do crescimento tumoral (Reynolds & Dweck, 1999). Já foi observada indução de apoptose em células de carcinoma escamoso de pulmão humano através de mecanismo que envolvem a família da Bcl-2 (LEE *et al.*, 2001a; LEE, 2001), inibição da progressão da fase S, e decréscimo na quantidade e a atividade da proteína kinase C, gerando apoptose em células de glioma *in vitro* (ACEVEDO-DUNCAN *et al.*, 2004), além de inibição da progressão do ciclo celular de G2 (que corresponde a fase pré-mitótica) para mitose em

células de câncer de bexiga humano *in vitro* (LIN *et al.*, 2006) e na inibição do crescimento de tumor neuroectodérmico humano em experimentos *in vivo* e *in vitro*, onde foi demonstrada ação seletiva da aloe emodina, já que não foram observadas alterações nas células controle (fibroblastos) submetidas ao tratamento (PECERE *et al.*, 2000). Porém, existem relatos de efeitos deletérios como genotoxicidade, mutagenicidade e até mesmo promoção de tumor (MULLER *et al.*, 1996; BRUSICK & MENGES, 1997).

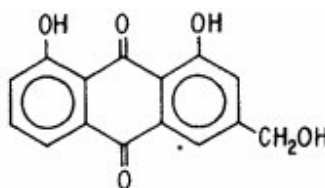


Figura 3. Estrutura da Aloe emodina. Fonte: PECERE *et al.*, 2000.

Evidências salientam, ainda, que os componentes de *Aloe vera* podem de fato agir sinergicamente de modo que o efeito desejado pode não aparecer caso as frações estejam separadas (REYNOLDS & DWECK, 1999; AKEV *et. al.*, 2007) e que plantas adultas apresentam maior atividade antioxidante (HU *et al.*, 2003). Experimentos que demonstram o efeito aditivo e sinérgico dos diferentes componentes de *Aloe* sp., realizados por Kametani *et. al.* (2007), mostraram que os efeitos anticâncer observados para a aloe emodina foram potencializados na presença de outros componentes do extrato de *Aloe vera* na redução da viabilidade de células do tumor ascite de Ehrlich.

5.3 - Mel

O mel é uma solução supersaturada de açúcares produzida a partir do processamento de néctares florais por abelhas melíferas, sendo que a espécie *Apis mellifera* é a mais popular e largamente utilizada na produção de mel para consumo humano (EMBRAPA, 2008). Na composição do mel, os açúcares glicose e frutose representam em média 38% e 31%, respectivamente, entretanto,

o mel ainda contém outras 181 substâncias distintas, muitas delas com propriedades anti-oxidantes (GHELDOLF *et al.*, 2002; PHILLIPS *et al.*, 2009, JAGANATHAN & MANDAL, 2009a). Dentre estes constituintes estão os ácidos fenólicos e flavonóides, algumas enzimas, ácido ascórbico, carotenóides, ácidos orgânicos, aminoácidos e proteínas (GHELDOLF *et al.*, 2002, EMBRAPA, 2008; NHB, 2009, JAGANATHAN & MANDAL, 2009a).

O mel exibe várias propriedades terapêuticas incluindo atividade antibacteriana, antifúngica, citostática e antioxidante (JEDDAR *et al.*, 1985; BARDY *et al.*, 2008).

Tem sido comprovado que estes componentes possuem efeito inibitório na proliferação e iniciação de células tumorais por hiporregulação de muitas vias enzimáticas como proteína tirosina quinase, cicloxigenase e ornitina descarboxilase (CHINTHALAPALLY *et al.*, 1993).

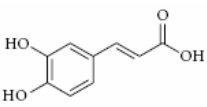
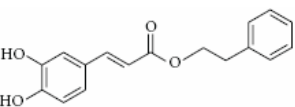
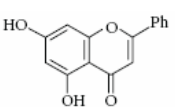
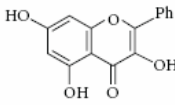
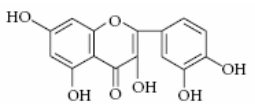
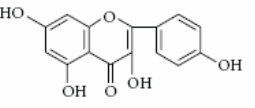
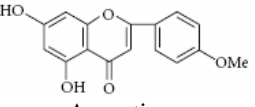
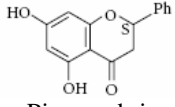
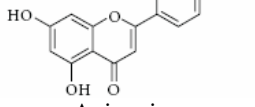
Experimentos de Swellam *et al.* (2003) mostraram inibição significativa do crescimento de tumores, induzidos por N-[4-(5nitro-2-furil)-2 tiazolil] formamida (FANFT), inoculados no subcutâneo de camundongos quando estes receberam administração oral ou injeções intratumorais de mel. Os autores também constataram que em estudos *in vitro*, com diversas linhagens de câncer de bexiga humano, os efeitos do mel promoviam inibição da proliferação celular e queda das aneuploidias, em relação aos controles.

Outros estudos mostraram que o mel auxiliou no combate ao câncer potencializando a atividade anti-tumor dos quimioterápicos 5-fluoracil e ciclofosfamida (WATTENBERG, 1986; GRIBEL' & PASHINSKII, 1990) e proporcionou ação preventiva, quando administrado oralmente associado a grãos de *Nigella*, contra o estresse oxidativo induzido e também contra carcinogênese (MABROUK *et al.*, 2002). Orsolic *et al.* (2004) demonstraram que o mel pode exercer atividade anti-metástases quando administrado antes da injeção tumoral.

Estudos recentes conduzidos por Jaganathan *et al.* (2009b) demonstraram que o mel induz apoptose em células de câncer de colon, através de interrupção do andamento do ciclo celular, por manter as células na fase G1 e ativação da caspase-3.

Os fenóis e polifenóis contidos no mel, tais como: ácido caféico, fenil-ésteres do ácido caféico, crisina, galangina, quercetina, campeferol, acacetina, pinocembrina e apigenina (Figura 3), tem se apresentado como promissores agentes farmacológicos no tratamento do câncer (JAGANATHAN & MANDAL, 2009a). Há muito vem se demonstrando que os polifenóis são anticarcinógenos, antiinflamatórios, antiaterogênicos, antitrombóticos, imunomodulatórios e antioxidantes (COOK & SAMMAN, 1996; CATAPANO, 1997; LOKU *et al.*, 1995; SALAH *et al.*, 1995).

Tabela 3. Fenóis e Polifenóis contidos no mel.

 <p>Ácido caféico</p>	 <p>Fenil-éster do ácido caféico</p>	 <p>Crisina</p>
 <p>Galangina</p>	 <p>Quercetina</p>	 <p>Campeferol</p>
 <p>Acacetina</p>	 <p>Pinocembrina</p>	 <p>Apigenina</p>

Fonte: JAGANATHAN & MANDAL, 2009a. Ph = fenil, Me = metil.

Estudos preliminares demonstraram que a presença de crisina parece reduzir a biodisponibilidade de carcinógenos da dieta (GALIJATOVIC *et al.*, 2001), além de funcionar de maneira semelhante às drogas anastrozol e letrozol, quimioterápicos utilizados contra o câncer de

mama (JEONG *et al.* 1999; KAO *et al.*, 1998), e induzir apoptose em linhagem leucêmica *in vitro* (WOO *et al.*, 2004).

Bardy *et al.* (2008) comentam que a utilização de mel no tratamento e cicatrização de feridas, até mesmo em pacientes oncológicos, está bem fundamentada, no entanto, quando se avalia a utilização do mel no combate ao tumor propriamente dito, existem apenas evidências, e que, portanto, mais estudos precisam ser realizados.

5.4 - Carcinossarcoma de Walker 256 e Modelo animal

O carcinossarcoma de Walker 256, originalmente um adenocarcinoma mamário, muito agressivo e espontâneo em ratas, é considerado o melhor modelo experimental, assemelhando-se ao quadro de câncer-caquexia humana (EMERY, 1999). Hoje essa linhagem é implantada em vários tecidos para diferentes estudos.

Experimentos prévios realizados com animais portadores de tumor de Walker 256, que receberam o homogeneizado de *Aloe vera* e mel, antes e/ou após o implante tumoral, apontaram que este tratamento, de modo geral, foi benéfico ao hospedeiro, resultando em diminuição do crescimento tumoral além de melhorar o ganho de peso, preservação da composição corpórea na forma de nitrogênio e gordura (corporal e perirrenal), o que aponta para provável diminuição da caquexia e da espoliação. Também houve evidências de que o composto provocaria diminuição no estresse oxidativo gerado pelo tumor (TOMASIN, 2007).

6 - OBJETIVOS

Em vista da importância de pesquisas que visam alternativas terapêuticas e também a comprovação de determinados padrões da medicina popular, bem como em função de alguns achados prévios, objetivamos verificar a ação do extrato de *Aloe vera* e mel na prevenção e no tratamento de câncer *in vivo*, analisando tanto o impacto no tecido tumoral quanto no hospedeiro, em modelo câncer-caquexia em ratos.

6.1 - Objetivos específicos:

- Avaliar a evolução tumoral (quanto ao peso calculado e absoluto) dos animais portadores do carcinossarcoma de Walker 256 submetidos ao tratamento com *Aloe vera* e mel.
- Analisar os parâmetros corporais (peso e ingestão) e morfométricos dos diferentes tecidos (fígado, músculo gastrocnêmio, coração, baço, gordura perirrenal, adrenais) do hospedeiro em função da evolução tumoral e composição corpórea química dos animais portadores ou não de tumor, tratados com *Aloe vera* e mel.
- No tecido tumoral, avaliar a proliferação celular *in vivo* durante o desenvolvimento do tumor nos animais tratados e não tratados com *Aloe vera* e mel através de ensaio imunohistoquímico, utilizando o antígeno nuclear Ki-67, que marca células em divisão. Avaliar também, em função do tratamento com *Aloe vera* e mel a susceptibilidade à apoptose (imunohistoquímica para fatores Bax (pró-apoptótico) e Bcl-2 (antiapoptose)), e teor de proteína, além das atividades enzimáticas da fosfatase alcalina (indicativo de atividade celular), enzimas anti-oxidantes, além da peroxidação de lipídios (indicativo de estresse oxidativo).
- Avaliação do hospedeiro a partir de análises séricas (proteína total, albumina e glicose) e dos tecidos hepático, muscular e cardíaco (conteúdo protéico, atividades enzimáticas: atividade celular, pela fosfatase alcalina, enzimas anti-oxidantes e produtos do estresse oxidativo, e imunohistoquímica do tecido hepático).

7 - MATERIAIS E MÉTODOS

7.1 - Procedimento experimental

7.1.1 - Preparo do homogeneizado de *Aloe vera* e mel:

Quinhentos gramas de folhas maduras, sadias e provenientes de exemplar de planta adulta *Aloe vera*, foram processados retirando-se apenas os espinhos laterais e homogeneizados, com auxílio de processador mecânico (Politron), junto à quinhentos gramas de mel de flores silvestres adquiridos da empresa Lambertucci – Industria, Comercio e Exportação Ltda (Registro no Ministério da Agricultura S.I.F/DIPOA sob nº0001/325, Rio Claro/SP) e 30mL etanol 30%. O composto obtido foi guardado a 4°C em recipiente escuro por 5 meses (ZAGO, 2004).

7.1.2 - Experimento 1: Ação de *Aloe vera* e Mel Sobre a Proliferação Celular e Apoptose:

Ratos Wistar adultos (110 dias; peso médio de 450g, mínimo de 5 animais por grupo) foram distribuídos em quatro grupos, com acesso à água e alimentação (ração comercial, Nuvlab) *ad libitum*, e durante os 20 dias de experimento receberam, por gavagem, o homogeneizado de *Aloe vera* e mel (grupos WA1e AC1) ou soro fisiológico (grupos CW1 e C1) na dose de dose de 670ul/kg de peso corporal/dia:

CC1: Controle – recebeu soro fisiológico, sem indução de tumor;

CW1: Controle-Tumor: recebeu indução de tumor e soro fisiológico, sendo no mínimo de 5 animais sacrificados a cada 7 dias após a inoculação do tumor ate o 21º dia após implante;

AC1: Controle - *Aloe vera* mel: recebeu o homogeneizado de *Aloe vera* e mel, sem indução de tumor;

WA1: Tumor - *Aloe vera* mel: recebeu indução do tumor e gavagem do homogeneizado de *Aloe vera* e mel, onde mínimo de 5 animais foram sacrificados a cada 7 dias após a inoculação tumoral até o 20º dia após implante;

A dose do homogeneizado administrada aos animais (670ul/kg de peso corporal/dia) foi calculada de acordo com Sistema Alométrico (ou Cálculo de Dosagem por Taxa Metabólica do Animal), através do qual é possível realizar a conversão de doses de medicamentos entre espécies de acordo com suas respectivas taxas metabólicas (FOWLER, 1993, adaptado pelo Médico Veterinário Paulo Anselmo Nunes Felipe - Responsável pelo Zoológico de Campinas, SP e membro da CEEA/UNICAMP). O cálculo da dosagem para os animais corresponde a 12,5 mL em humanos (homem com peso médio de 70Kg).

A indução do carcinossarcoma de Walker 256 foi feita no primeiro dia do experimento através da inoculação subcutânea, no flanco direito de cada animal, de aproximadamente 1×10^6 células neoplásicas viáveis por inóculo, obtidas diretamente de animais doadores. Os animais com tumor foram avaliados de acordo com a UKCCR (VALE *et al.*, 2005), e o protocolo experimental deste projeto foi aprovado pelo Comitê em Experimentação Animal/Unicamp, sob número de protocolo 1400-1.

O sacrifício dos animais com tumor foi realizado após 7, 14 e 20 dias da inoculação tumoral, ou em estado pré-agônico. Foram coletados tecidos tumoral e hepático para análise da proliferação celular por imunohistoquímica através de marcação nuclear do antígeno Ki-67 e dos fatores citoplasmáticos Bax e Bcl-2.

7.1.3 - Experimento 2: Avaliação da Eficácia Terapêutica do Homogeneizado de *Aloe vera* e mel:

Ratos Wistar jovens (21 dias, 60 gramas) foram ou não tratados com o homogeneizado de *Aloe vera* e mel até a fase adulta (105 dias, 410 gramas), avaliando-se os efeitos terapêuticos. Inicialmente os animais foram distribuídos em dois grupos: grupo A2, que recebeu o homogeneizado de *Aloe vera* e mel por gavagem na dose de 670ul/kg de peso corporal/dia, durante 12 semanas (5 dias por semana) e o grupo C2 (controle), que recebeu, também por gavagem, soro fisiológico no mesmo volume da dose dos tratados. Os dois grupos tiveram acesso à água e alimentação *ad libitum*.

Ao final deste período de tratamento (12 semanas), os animais (105 dias de idade) foram redistribuídos em seis grupos, com mínimo de 7 animais por grupo:

O grupo A2 foi subdividido em três grupos:

AC2: Controle - *Aloe vera* mel: os ratos continuaram a receber o homogeneizado sem sofrerem indução de tumor;

AW2: *Aloe vera* mel - Tumor: após 12 semanas foi interrompida a gavagem do homogeneizado e, então, os animais receberam indução do tumor;

AWA2: *Aloe vera* mel -Tumor - *Aloe vera* mel: os animais continuaram recebendo o homogeneizado após a indução do tumor.

O grupo C2 foi subdividido em:

CC2: Controle: os ratos receberam apenas gavagem com soro fisiológico;

CW2: Controle-Tumor: após 12 semanas, os animais continuaram a receber soro fisiológico, após serem inoculados com tumor;

CWA2: Controle - Tumor - *Aloe vera* mel: os animais passaram serem tratados com homogeneizado após sofrerem a indução do tumor.

A indução tumoral foi realizada com inoculação de células neoplásicas no subcutâneo do flanco direito, similar ao procedimento do primeiro experimento, conforme descrição acima. A avaliação da evolução tumoral foi feita duas vezes por semana pelo peso calculado do tumor, até o dia do sacrifício (21 dias de crescimento tumoral); esse calculo foi obtido a partir das três medidas lineares do tumor (comprimento, largura e espessura) (GOMES *et al.*, 1983).

Durante todo o segundo experimento, foi feita a medida de peso corpóreo dos animais e o monitoramento de ingestão de água e alimento uma vez por semana. Após a indução de tumor, foi verificada a incidência tumoral pela detecção do tumor palpável, bem como o acompanhamento da evolução tumoral. O ganho de peso corpóreo total, antes e após a indução tumoral até o sacrifício (21 dias), foi calculado a partir da seguinte fórmula:

$$\text{Ganho de Peso (21 dias)} = (P_f - P_t) - P_i$$

Onde P_f corresponde ao peso final do animal, no dia do sacrifício; P_t corresponde ao peso do tumor e P_i corresponde ao peso inicial do animal, antes da indução de tumor..

Após 21 dias de implante tumoral ou momentos antes do estado pré-agônico, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, retirando-se sangue, órgãos e tecidos (fígado, coração, músculo gastrocnêmio direito e esquerdo, baço, rins, adrenais, gordura perirrenal, tumor). Após a dissecação desses tecidos foi registrado o peso da carcaça (corpo do animal sem o trato gastrointestinal). Foram, então, registrados e determinados os pesos absoluto e relativo de todos os órgãos e tecidos, e esses foram guardados a -20°C para posteriores análises bioquímicas.

7.2 - Análises do material coletado

7.2.1 – Análise do estresse oxidativo: Atividade Enzimática tecidual

Os tecidos coletados foram homogeneizados em tampão HB e centrifugados a 13400 xg por 15 minutos. As amostras teciduais homogenizadas foram utilizadas para análise da atividade das

enzimas fosfatase alcalina, glutationa-S-transferase, catalase e superóxido dismutase, bem como para análise do teor de MDA e proteína total (BRADFORD, 1976).

Para análise da fosfatase alcalina foi utilizado 10 μ L do homogenizado em solução reagente de p-NPP (4-nitrofenil fosfato disódico) à 37mM (MARTINS *et al.*, 2001). A atividade da enzima foi determinada em nmol/ μ g proteína.

Atividade enzimática da glutationa-S-transferase foi avaliada segundo método descrito por Schäffer *et al.* (1988), utilizando-se 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) à concentração de 1mM de glutationa redutase, fazendo-se leitura em espectrofluorímetro nos tempos zero, 30 e 60 minutos em 280nm. Os resultados foram expressos como η mol por μ g de proteína tecidual por minuto.

O procedimento bioquímico para determinação da atividade enzimática da catalase na amostra foi realizada pela presença de peróxido de hidrogênio e leitura em 480 η m, segundo método de Cohen *et al.* (1970). Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias por μ g de proteína tecidual por minuto.

A determinação da superóxido dismutase (SOD) foi feita na amostra avaliando-se a degradação de *horseradish peroxide* e dimethylaniline como substrato para atividade da enzima incubada em 4-aminofenazona, após incubação com 400mMol de riboflavina, comparando-se a variação da leitura em espectrofotômetro (540 η m). Os dados foram calculados como unidade arbitrária de densidade óptica corrigida pela proteína tecidual, em comparação aos dados obtidos pelos animais dos respectivos controles (TANG *et al* 2002).

A concentração de MDA na amostra foi avaliada segundo método descrito por Gomes-Marcondes & Tisdale (2002), utilizando-se N-metil-2-fenilindol como reagente e HCl (12N), contra branco e padrão 1,1,3,3-tetrametoxipropano (0,1mM) em espectrofotômetro à 570nm. Dados expressos em η mol por μ g de proteína tecidual.

7.2.2 - Composição Corpórea

A composição corpórea foi determinada quanto ao teor de água, por secagem, até obtenção do peso constante da carcaça do animal, e teor de gordura total da carcaça seca foi realizada utilizando-se extração com solvente orgânico, éter de petróleo (VENTRUCCI *et al.*, 2004).

7.2.3 - Imunohistoquímica

Amostras dos tumores e do tecido hepático foram coletadas e fixadas em paraformaldeído (4%) por 24 horas, seguindo-se então a inclusão em parafina e confecção das lâminas com cortes histológicos de 5µm de espessura, obtidos com auxílio do micrótomo.

Os ensaios imunohistoquímicos seguiram o seguinte protocolo, adaptado de Oliveira & Bacchi (2002):

Os cortes foram desparafinizados com banhos de xilol, hidratados através de banhos em série de álcool etílico decrescente (100%, 90%, 80%, 70% e 50%) e lavados com PBS (tampão fosfato-salino, pH 7,4). A seguir foi realizado o bloqueio das peroxidases endógenas com solução de H₂O₂ 3%. A recuperação de epítomos foi realizada a partir de incubação em tampão citrato 0,01N pH 6,4, em microondas, por dez minutos, sendo o primeiro em potência máxima e os demais em potência média (Microondas Consul Facile|Compacto). Os cortes foram então incubados a 4°C *overnight* com os respectivos anticorpos primários Ki-67 (rabbit polyclonal anti-Ki67; AnaSpec, Inc., San Jose, CA, USA), Bax (monoclonal mouse anti-Bax; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) e Bcl-2 (monoclonal mouse anti-Bcl-2; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) na diluição 1:100, seguida de nova lavagem com PBS e incubação por 60 minutos com anticorpo secundário biotilado adequado na diluição de 1:400. Para amplificação do sinal, empregou-se kit

ABC (EP-ABCu, Super ABC Kit, Easy Path) conforme recomendações do fornecedor. A revelação foi feita com solução DAB (diaminobenzidina tetrahydroclorido) e então foi feita contra-coloração com Hematoxilina de Harris, secagem *overnight* e montagem com Entelan (Sigma). Foi utilizado sistema de aquisição de imagem para contagem do número de células positivas, utilizando-se software Image Pro-Plus (Cybernetics, Silver Spring, USA) e sistema de captura de imagem de microscopia de luz (microscópio óptico, Leica DMLS).

A porcentagem de células marcadas no tecido foi calculada com base no número de células marcadas em relação ao total de células contadas. Foram contadas cerca de 300 células em três campos aleatórios, com área fixa de $12\mu\text{m}^2$ (LING-FEI *et al.*, 2006 e FOGLIENI *et al.*, 2001).

7.2.4 - Dosagens séricas:

O sangue coletado foi submetido à centrifugação, 13400 xg, por 15 min, para a obtenção do plasma que posteriormente foi utilizado para dosagem de glicose (kit para glicose enzimática LABORLAB), proteína sérica total e albumina (kits LABORLAB).

7.3 Análise Estatística

Foram utilizados métodos estatísticos adequados, para cálculo das médias e erro padrão das médias. Para comparação das medias dos animais do primeiro experimento, utilizou-se comparação por Teste-*t student* não pareado. Para analise estatística para os animais do segundo experimento e comparação dos múltiplos grupos por ANOVA (Análise de Variância *one-way*) seguido de teste Bomferroni. Para ambas analises, determinou-se significância estatística para P menor que 5% (GAD & WEIL, 1994).

8. RESULTADOS E DISCUSSÃO

8.1 - Experimento 1 - Proliferação Celular e Apoptose:

Nossos resultados mostram que o efeito negativo sobre o crescimento tumoral provocado pelo homogeneizado de *Aloe vera* e mel pôde ser notado através do tamanho atingido pelo tumor ao longo dos dias após implante tumoral (Figura 4), onde a média dos tumores coletados no sétimo, décimo quarto e vigésimo dia de implantação de animais tratados (WA1) apresentaram-se menores em relação aos tumores de animais não tratados (CW1), sendo esta diferença acentuada ao longo do tempo.

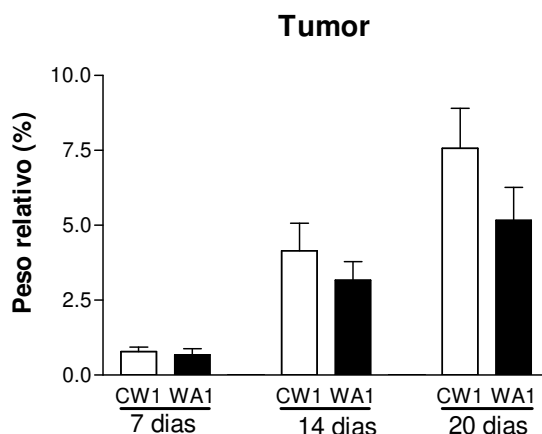


Figura 4. Porcentagem de peso relativo do tumor (%) após 7, 14 e 20 dias de implante. CW1: Controle Tumor (barras escuras), WA1: Tumor - *Aloe vera* (barras claras).

Os dados obtidos corroboram pesquisas que demonstram que *Aloe vera* e seus componentes atuam sobre o tumor, sendo capaz de reduzir a massa tumoral, os focos e frequência de metástases (GRIBEL' & PASHINSKII, 1986; PENG *et al.*, 1991 e MERRIAM *et al.*, 1996). Inibição de crescimento tumoral também foi obtida através da utilização de mel (SWELLAM *et al.*, 2003).

O tecido tumoral coletado neste experimento foi então submetido à imunohistoquímica para detecção da proteína nuclear Ki-67, a fim de verificar as taxas de proliferação celular; e das proteínas Bax, que possui atividade pró-apoptótica; e Bcl-2, que possui atividade anti-apoptótica.

A porcentagem de células expressando Ki-67 em um determinado grupo celular (Ki67-LI) representa a fração em crescimento da população celular analisada. A expressão do antígeno nuclear

Ki-67 foi estatisticamente menor para os tumores dos animais tratados com *Aloe vera* e mel (WA1) em relação aos controles (CW1), no 14º e 20º dia após implante tumoral (Figuras 5 e 6) (Controle negativo para confirmação da reação foi realizado para esse ensaio, colocando-se as laminas para reação apenas com o anticorpo secundário, seguido do procedimento de marcação e coloração, conforme explicado em “Materiais e Métodos”; as imagens estão apresentadas no Anexo 1).

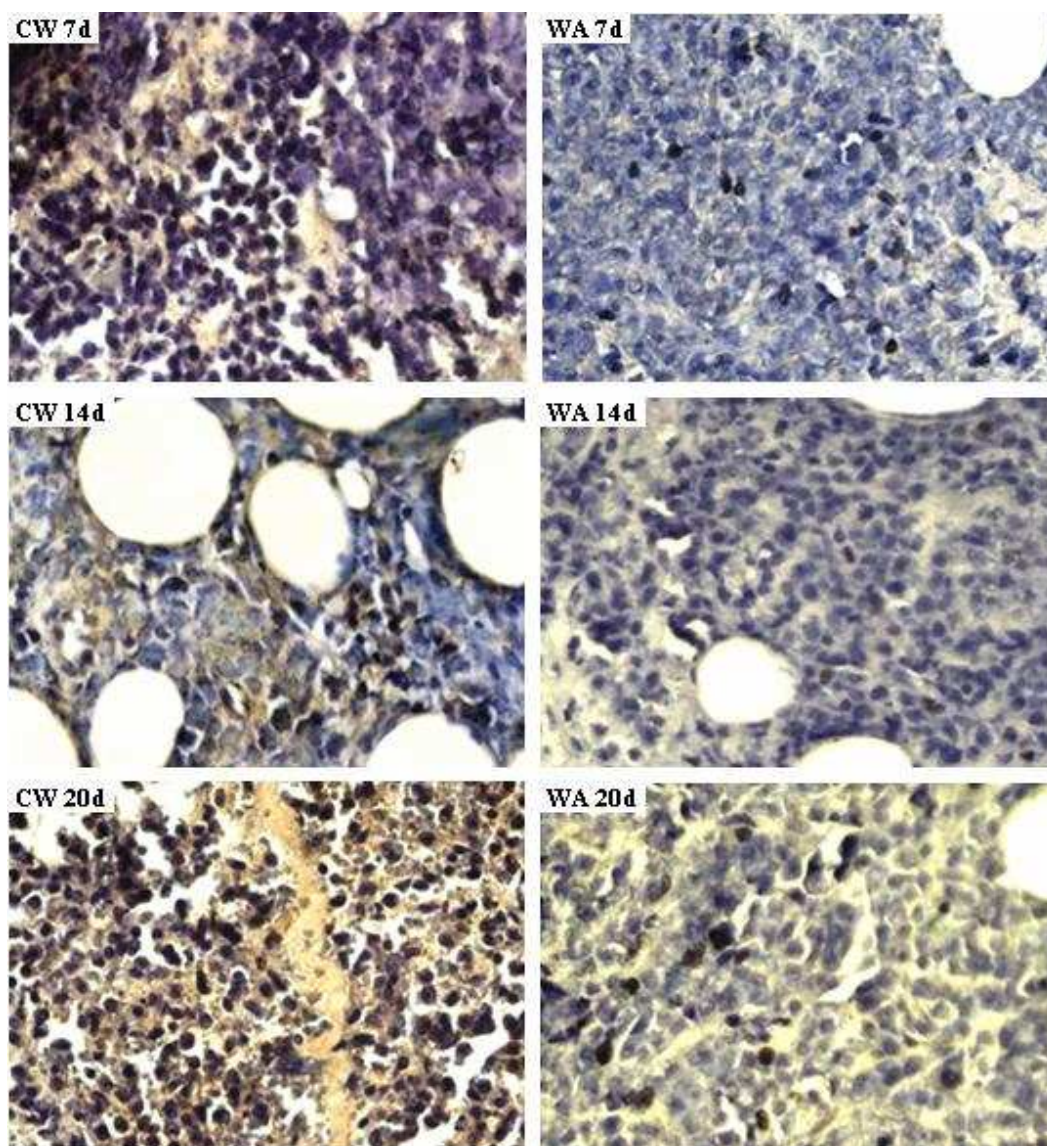


Figura 5. Expressão de Ki-67 em cortes de tumores dos grupos controles e tratados com homogenizado *Aloe vera* e mel. CW = Controle-Tumor; WA = Tumor-*Aloe vera* e mel, ambos os grupos referente ao primeiro experimento; 7d = após 7 dias de desenvolvimento; 14d = após 14 dias de desenvolvimento; 20d após 20 dias de desenvolvimento. Os núcleos das células que contém Ki-67 apresentam-se escuros. Aumento histológico de 400x.

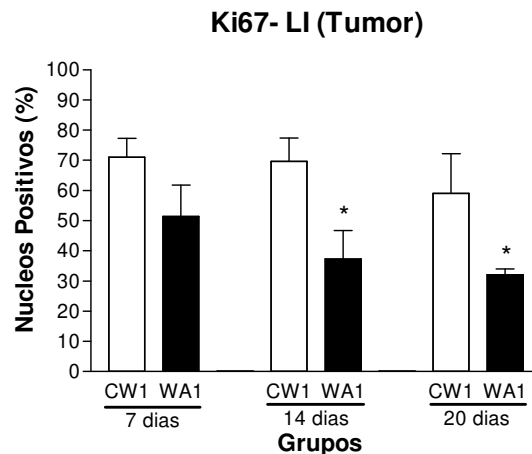


Figura 6. Ki67-LI determinado nos cortes histológicos dos tumores dos grupos experimentais controle e tratados com homogenizado de *Aloe vera* e mel ao longo do tempo de desenvolvimento tumoral. CW1: Controle Tumor (barras escuras), WA1: Tumor - *Aloe vera* (barras claras). * $P < 0.05$ para comparação entre o grupo controle (CW1) e grupo tratado (WA1).

No câncer, o alto valor do Ki67-LI implica em rápido crescimento e, em muitos casos, está relacionado à agressividade do tumor e ao baixo prognóstico (BUSH *et al.*, 1991; SCHOLZEN & GERDES, 2000). A redução observada no Ki67-LI dos tumores do grupo WA1 sugere que a administração de *Aloe vera* e mel foi capaz de desacelerar a progressão tumoral através da diminuição da taxa de proliferação celular.

Outro mecanismo usualmente envolvido no controle da progressão e crescimento tumoral é o processo de morte celular, especialmente a apoptose, principal mecanismo de morte celular presente em órgãos e tecidos saudáveis, e, deficiente no câncer. Sabe-se que proteínas da família da Bcl-2 estão envolvidas na regulação do processo apoptótico. Entre elas, a Bax possui atividade pró-apoptótica enquanto a própria Bcl-2 apresenta atividade anti-apoptótica (VAUX *et al.*, 1988; OLTVAI *et al.*, 1993). Sendo assim, o balanço entre a quantidade de Bax e Bcl-2 poderia determinar a ocorrência de apoptose.

Nos tumores analisados, a expressão do fator pró-apoptótico Bax inicialmente não apresentou diferenças entre os dois grupos; no entanto; no 20º dia após a indução tumoral houve significativa queda na expressão em CW1, quando comparado aos dias acessados anteriormente (CW1 no 7º dia e no 14º dia) e, concomitantemente, houve expressivo aumento na expressão em WA1 (Figuras 7 e 8)

(conforme descrito anteriormente, controle negativo para confirmação da reação também foi realizado para esse ensaio; as imagens estão apresentadas no Anexo 2).

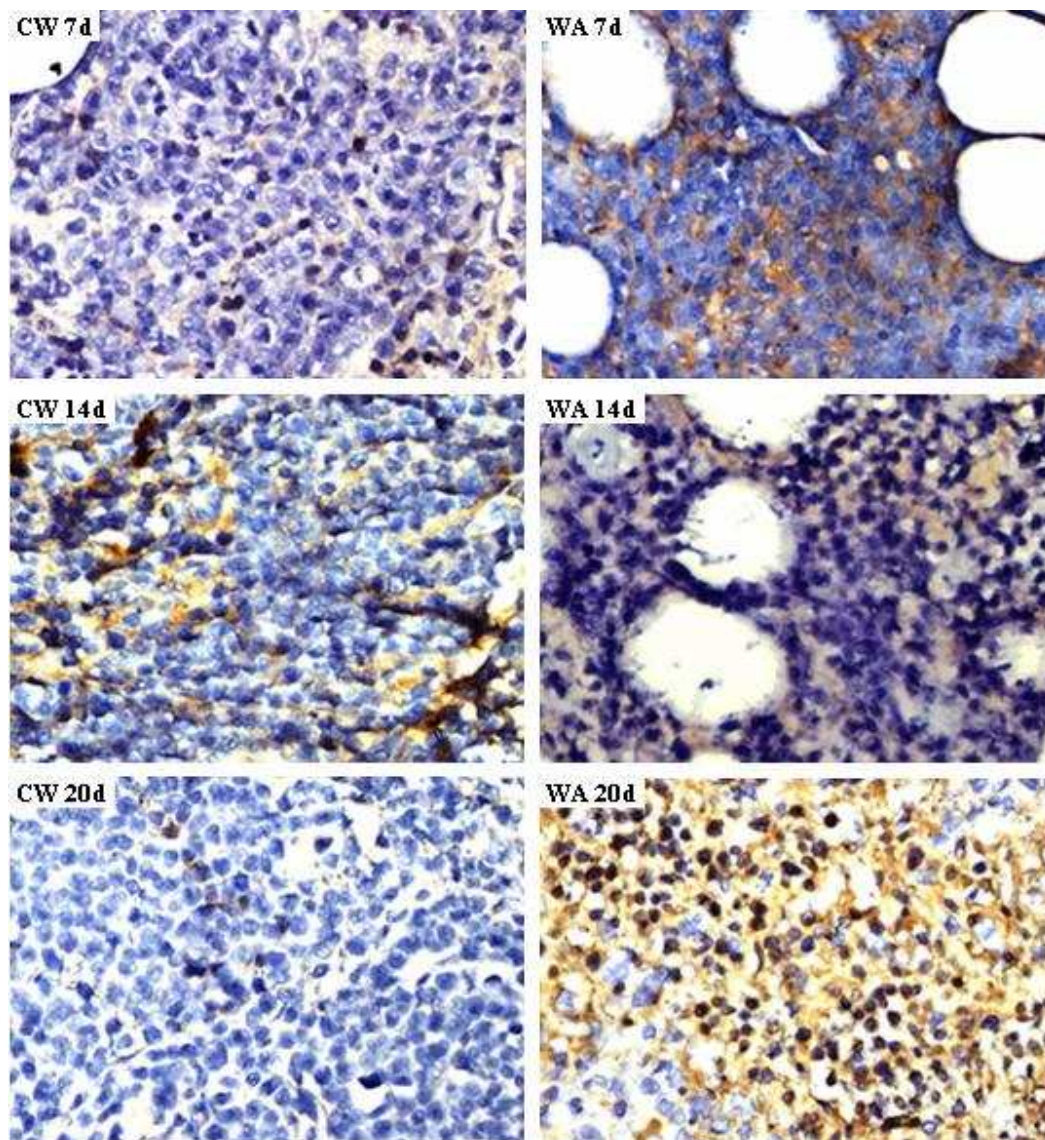


Figura 7. Expressão da proteína Bax em cortes de tumores dos grupos controles e tratados com homogenizado *Aloe vera* e mel. CW = Controle-Tumor; WA = Tumor-*Aloe vera* e mel, ambos os grupos referentes ao primeiro experimento; 7d = após 7 dias de desenvolvimento; 14d = após 14 dias de desenvolvimento; 20d após 20 dias de desenvolvimento. As células que expressam Bax apresentam citoplasma marrom. Aumento histológico de 400x.

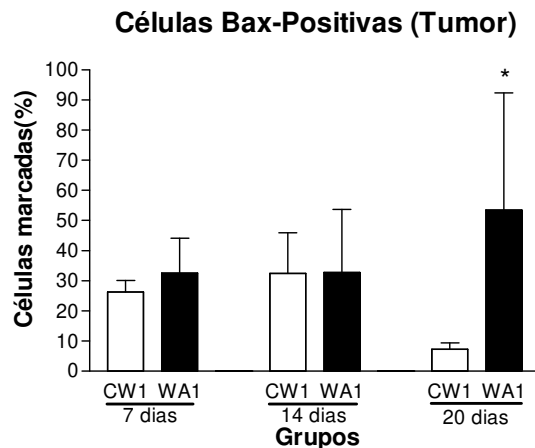


Figura 8. Expressão da proteína Bax determinada nos cortes histológicos dos tumores dos grupos experimentais controle e tratados com homogenizado de *Aloe vera* e mel ao longo do tempo de desenvolvimento tumoral. CW1: Controle Tumor (barras escuras), WA1: Tumor - *Aloe vera* e mel (barras claras). * $P < 0.05$ para comparação entre o grupo controle (CW1) e grupo tratado (WA1).

Esses dados sugerem que, sem tratamento, a tendência ao longo do desenvolvimento tumoral, especialmente nas fases finais, é de diminuição da expressão de Bax, como já mencionado, importante fator pró-apoptótico. A administração oral de *Aloe vera* e mel poderia atuar de maneira a reverter esta tendência, podendo até mesmo aumentar a expressão de Bax após período maior de tratamento.

Atuando funcionalmente de maneira oposta à Bax, a proteína anti-apoptótica Bcl-2 foi menor nos tumores advindos de animais tratados com *Aloe vera* e mel (WA1) que a apresentada por tumores controle (CW1), especialmente nos períodos inicial e intermediário do experimento (Figuras 9 e 10) (Controle negativo para confirmação da reação também foi realizado para esse ensaio; as imagens estão apresentadas no Anexo 3).

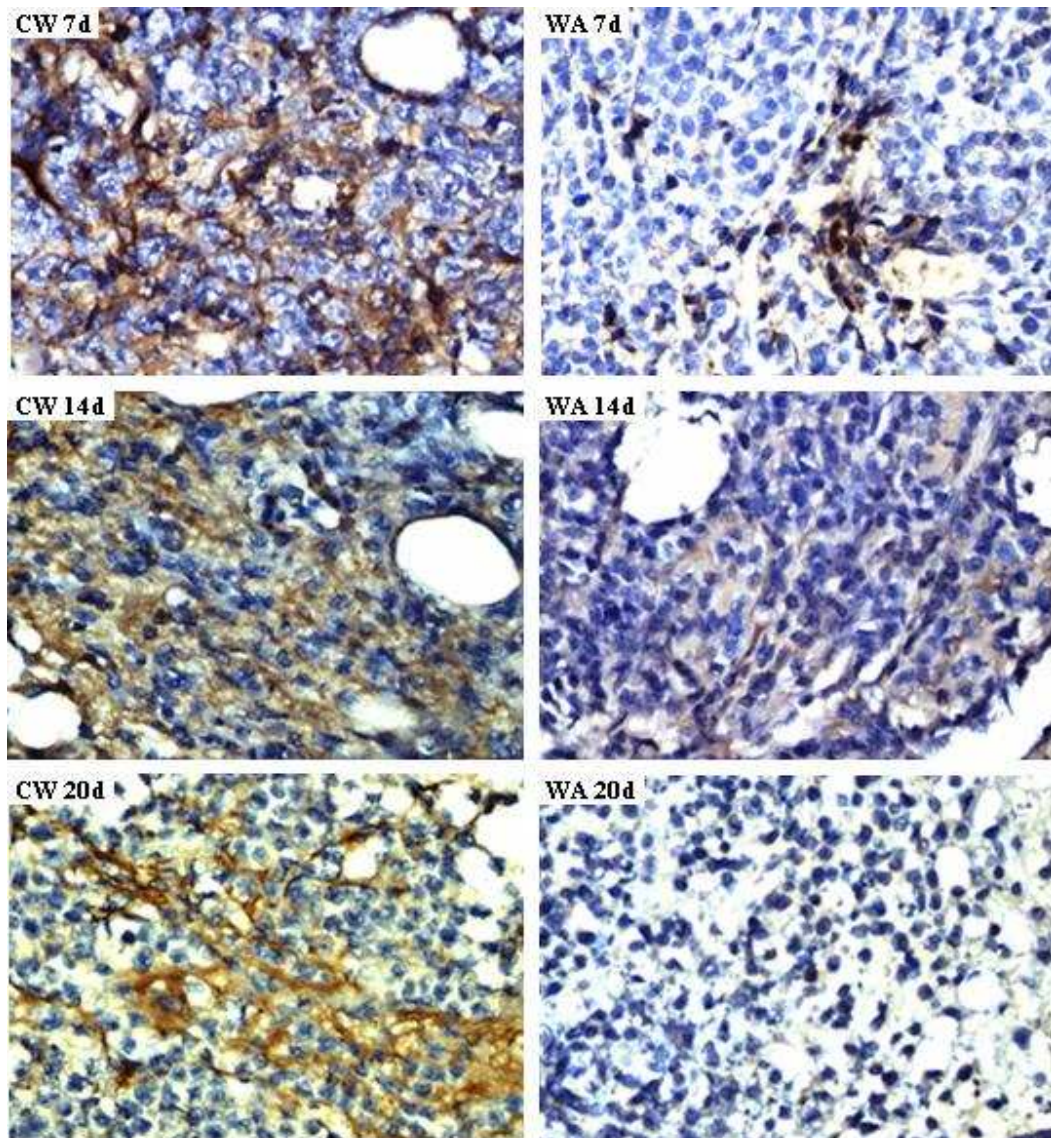


Figura 9. Expressão da proteína Bcl-2 em cortes de tumores dos grupos controles e tratados com homogenizado *Aloe vera* e mel. CW = Controle-Tumor; WA = Tumor-*Aloe vera* e mel, ambos os grupos referentes ao primeiro experimento; 7d = após 7 dias de desenvolvimento; 14d = após 14 dias de desenvolvimento; 20d após 20 dias de desenvolvimento. As células que expressam Bax apresentam citoplasma marrom. Aumento histológico de 400x.

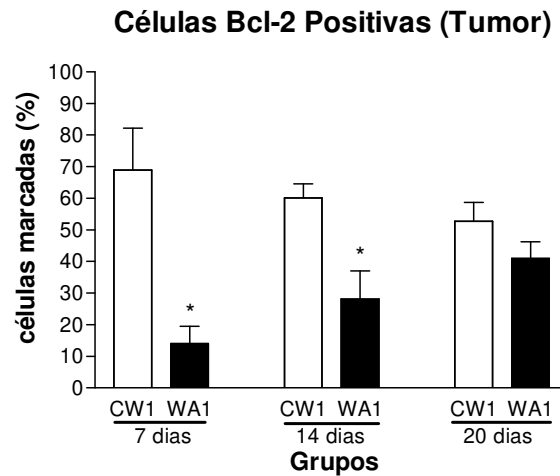


Figura 10. Expressão da proteína Bcl-2, determinada nos cortes histológicos dos tumores dos grupos experimentais controle e tratados com homogenizado de *Aloe vera* e mel ao longo do tempo de desenvolvimento tumoral. CW1: Controle Tumor (barras escuras), WA1: Tumor - *Aloe vera* e mel (barras claras). * $P < 0.05$ para comparação entre o grupo controle (CW1) e grupo tratado (WA1).

A superexpressão de Bcl-2 é uma característica comum a diversos tipos de tumores, especialmente dos reincidentes e quimioresistentes (REED *et al.*, 1996; KRAJEWSKA *et al.*, 1996; BORNER *et al.*, 1999; VILLAR *et al.*, 2001; TOTHOVA *et al.*, 2002), sendo um importante alvo para novas terapias anticancer (AN *et al.*, 2004).

Houve queda significativa na expressão de Bcl-2 apresentada pelos tumores WA1 em relação aos CW1 logo no início do período experimental (7º dia de implantação), sugerindo possível modulação gerada pela administração de *Aloe vera* e mel. Embora a amplitude de expressão de Bcl-2 tenda a se aproximar entre os grupos CW1 e WA1 ao longo do período experimental, um dado muito importante e que foi considerado é a razão entre Bax e Bcl-2 (Figura 11), uma vez que já foi proposto que a relação Bax/Bcl-2 poderia governar a sensibilidade das células aos estímulos apoptóticos (GAZZANIGA *et al.*, 1996; THOMAS *et al.*, 1996).

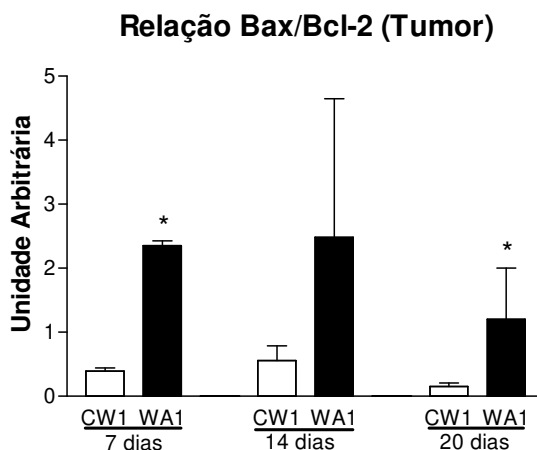


Figura 11. Relação Bax/Bcl-2 determinada através da expressão das proteínas Bax e Bcl-2 nos cortes histológicos dos tumores dos grupos experimentais controle e tratados com homogenizado de *Aloe vera* e mel ao longo do tempo de desenvolvimento tumoral. CW1: Controle Tumor (barras escuras), WA1: Tumor - *Aloe vera* (barras claras). * $P < 0.05$ para comparação entre o grupo controle (CW1) e grupo tratado (WA1).

A análise da relação Bax/Bcl-2 apresentou elevação no grupo tratado (WA1) em todos os dias acessados ao longo do experimento, com significância nos 7º e 20º dias após implante, o que sugere aumento na propensão à apoptose nos tumores cujos animais receberam tratamento com *Aloe vera* e mel. Em concordância com os resultados obtidos, trabalhos já demonstraram que diversos componentes da *Aloe vera* ou do mel podem modular a apoptose através de uma gama de mecanismos diferentes, entre eles regulação sobre proteínas da família da Bcl-2 (LIN *et al.*, 2006; CHOI *et al.*, 2008). Outros estudos ainda demonstraram sinergismo entre os componentes de *Aloe vera* no aumento da eficiência para indução de apoptose (KAMETANI *et al.*, 2007).

A fim de avaliar o impacto tanto do tumor, quanto do tratamento oral com *Aloe vera* e mel sobre outros tecidos hospedeiros, foram feitas análises imunohistoquímicas para determinar a expressão de Ki-67, Bax e Bcl-2 no tecido hepático desses mesmos animais e de animais saudáveis tratados (CA1) ou não (CC1) com *Aloe vera* e mel.

A expressão do antígeno nuclear Ki-67 no tecido hepático também apresentou variações entre os grupos e ao longo do experimento (Figuras 12 e 13, Controle negativo no Anexo 4). O Ki-67-LI tendeu a aumentar no grupo tratado com *Aloe vera* e mel (WA1) apenas no início do desenvolvimento

tumoral (Figura 13), o que poderia refletir em tentativa do hospedeiro aumentar a capacidade de metabolização dos fatores tóxicos liberados pelo tumor. No entanto, nos dias subsequentes (décimo quarto e vigésimo), houve tendência à queda no índice de proliferação celular (Ki-67-LI) hepático tanto no grupo não tratado (CW1) quanto no tratado (WA1), podendo ser influenciado tanto por aumento na taxa de morte celular quanto por alterações no ciclo celular (MAJNO & JORIS, 1995; DAI Y & GRANT, 2007). O fígado apresenta capacidade de proliferação e regeneração em situações adversas (FAUSTO *et al.*, 2006, KUNG & FORBES, 2009). Já foi demonstrado que *Aloe vera*, mel e alguns de seus componentes manteriam a capacidade proliferativa normal em células saudáveis, ao mesmo tempo que provocariam danos em células tumorais (CHOI *et al.*, 2001; ESUAA & RAUWALDB, 2006; NERADIL *et al.*, 2003; BRAGANHOL *et al.*, 2006; CHIANG *et al.*, 2006).

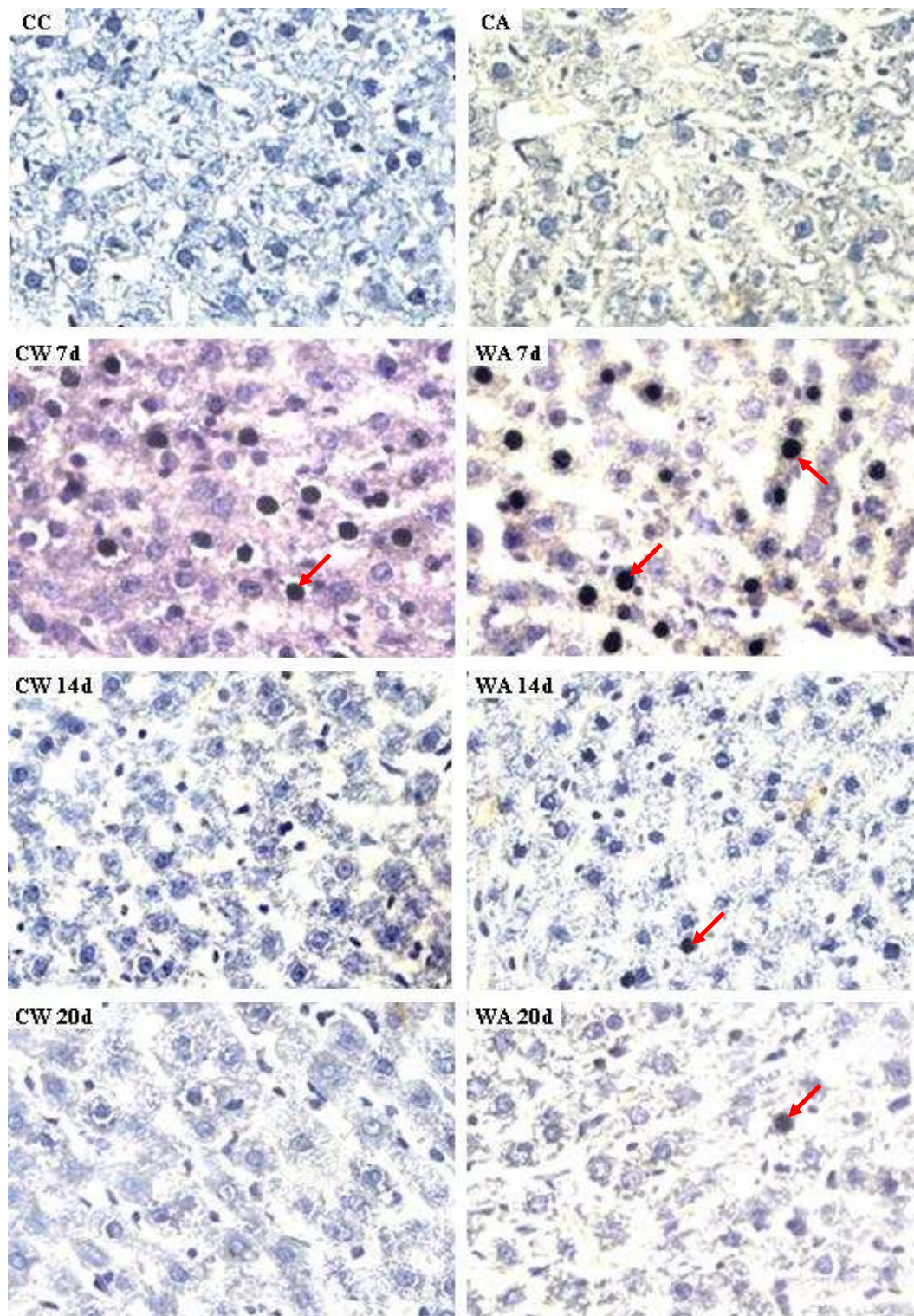


Figura 12. Expressão de Ki-67 em cortes de tecido hepático dos grupos controles e tratados com homogenizado *Aloe vera* e mel com e sem implante tumoral. CC = Controle; CA= Controle-*Aloe vera* e mel; CW = Controle-Tumor; WA = Tumor-*Aloe vera* e mel, os quatro grupos referem-se ao primeiro experimento; 7d = após 7 dias de desenvolvimento; 14d = após 14 dias de desenvolvimento; 20d = após 20 dias de desenvolvimento. As setas apontam exemplos de núcleos positivos para Ki-67 (mais escuros). Aumento histológico de 400x.

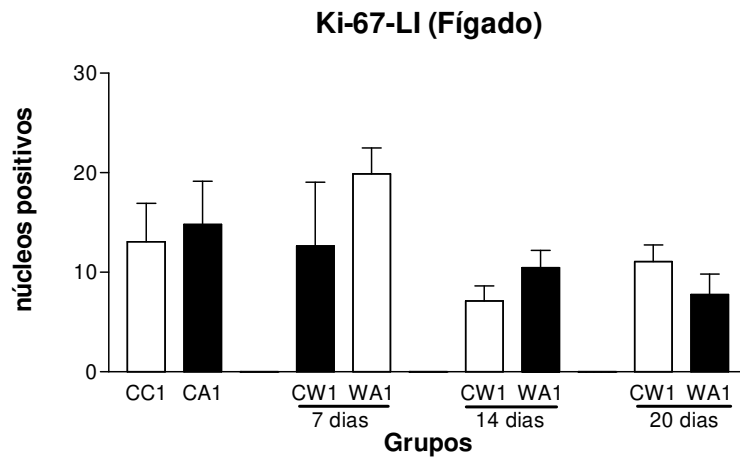


Figura 13. Ki67-LI determinado nos cortes histológicos do tecido hepático dos grupos experimentais controle e tratados com homogenizado de *Aloe vera* e mel ao longo do tempo de desenvolvimento tumoral.. – CC1 = Controle; CA1= Controle-*Aloe vera* e mel; CW1: Controle Tumor, WA1: Tumor - *Aloe vera*.

A análise da expressão da proteína pró-apoptótica Bax no fígado através de imunohistoquímica (Figura 14, Controle negativo no Anexo 5) sugere tendência à elevação no número de células Bax-positivas no grupo não tratado (CW1) apenas no décimo quarto dia de evolução tumoral, enquanto o grupo tratado (WA1) apresenta valores próximos aos controles CC1 e CA1 (Figura 15). A administração de *Aloe vera* e mel provavelmente auxiliou na modulação da expressão de Bax mesmo na presença de estímulos nocivos advindos do metabolismo do tumor em crescimento.

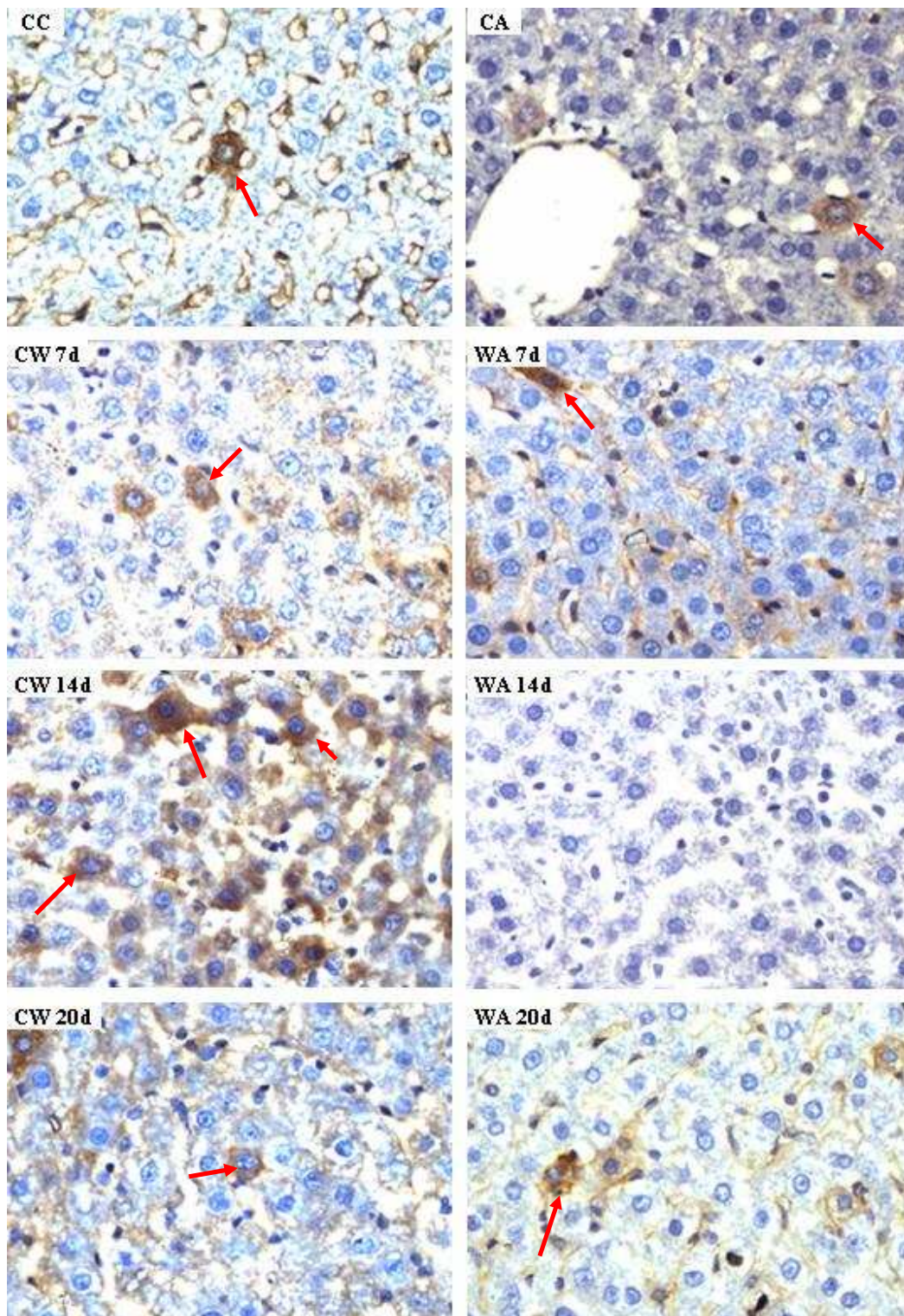


Figura 14. Expressão da proteína Bax em cortes de tecido hepático dos grupos controles e tratados com homogenizado *Aloe vera* e mel com e sem implante tumoral. CC = Controle; CA= Controle-*Aloe vera* e mel; CW = Controle-Tumor; WA = Tumor-*Aloe vera* e mel, os quatro grupos referem-se ao primeiro experimento; 7d = após 7 dias de desenvolvimento; 14d = após 14 dias de desenvolvimento; 20d após 20 dias de desenvolvimento. As células que expressam Bax apresentam citoplasma marrom (Setas vermelhas apontam alguns exemplos). Aumento histológico de 400x.

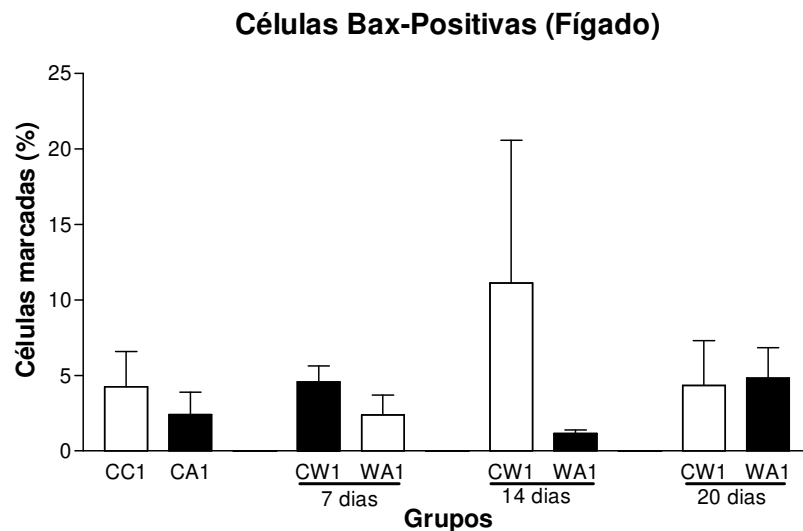


Figura 15. Expressão da proteína Bax determinada nos cortes histológicos do tecido hepático dos grupos experimentais controle e tratados com homogenizado de *Aloe vera* e mel ao longo do tempo de desenvolvimento tumoral. – CC1 = Controle; CA1= Controle-*Aloe vera* e mel; CW1: Controle Tumor, WA1: Tumor - *Aloe vera*.

Paralelamente, a expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 no fígado dos animais portadores de tumor também variou entre os grupos tratados (WA1) ou não (CW1) com *Aloe vera* e mel, bem como com o tempo de implante tumoral (Figuras 16 e 17, Controle negativo no Anexo 6). Inicialmente (sétimo dia de implante), a expressão de Bcl-2 pelas células hepáticas tendeu a aumentar nos dois grupos (CW1 e WA1), sendo este aumento provavelmente resposta aguda na tentativa de sobreviver aos fatores advindos do tumor liberados na circulação. No entanto, a expressão de Bcl-2 caiu progressivamente ao longo do período experimental também nos dois grupos de animais portadores de tumor.

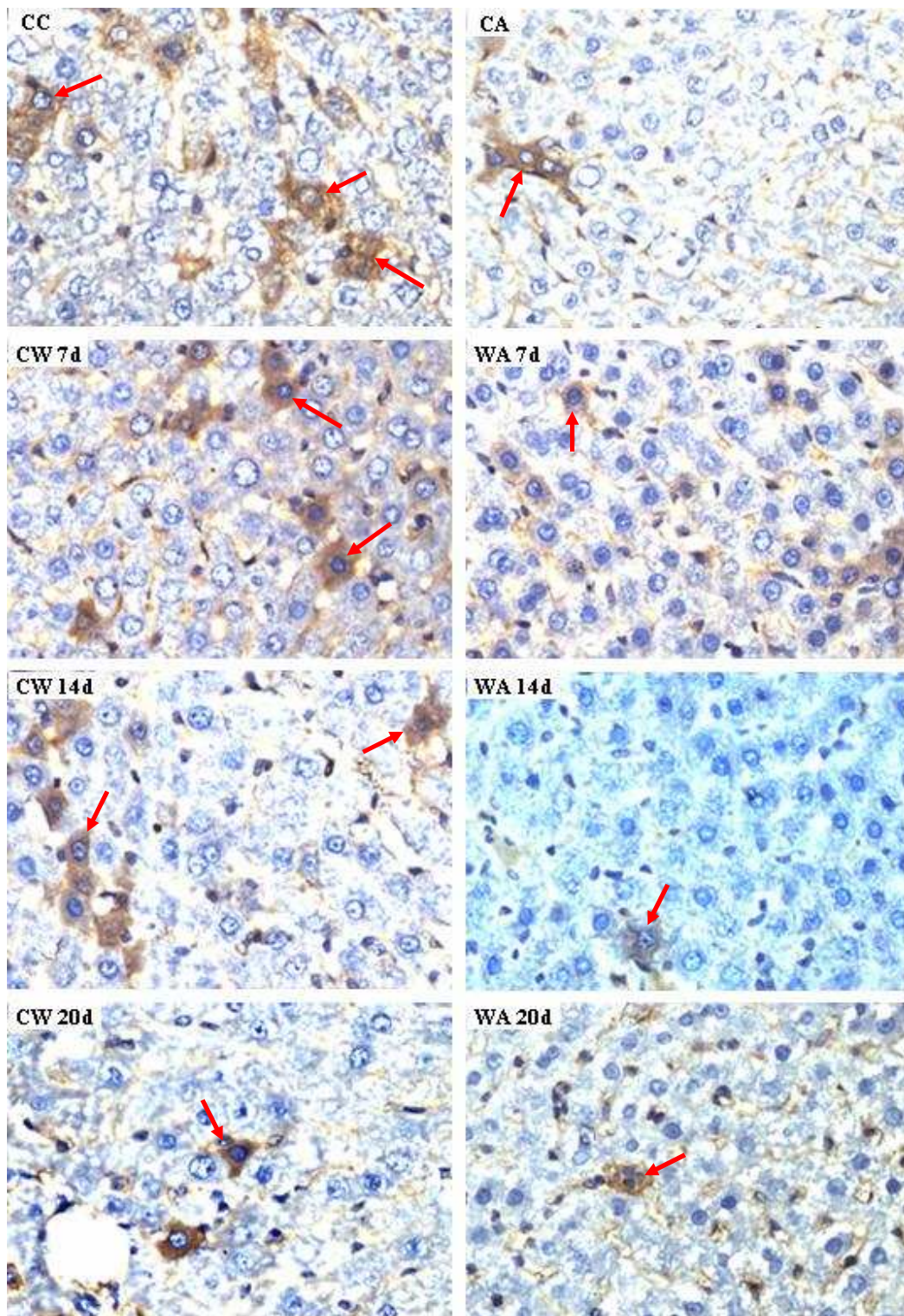


Figura 16. Expressão da proteína Bcl-2 em cortes de tecido hepático dos grupos controles e tratados com homogenizado *Aloe vera* e mel com e sem implante tumoral. CC = Controle; CA= Controle-*Aloe vera* e mel; CW = Controle-Tumor; WA = Tumor-*Aloe vera* e mel, os quatro grupos referem-se ao primeiro experimento; 7d = após 7 dias de desenvolvimento; 14d = após 14 dias de desenvolvimento; 20d após 20 dias de desenvolvimento. As células que expressam Bcl-2 apresentam citoplasma marrom (Setas vermelhas apontam alguns exemplos). Aumento histológico de 400x.

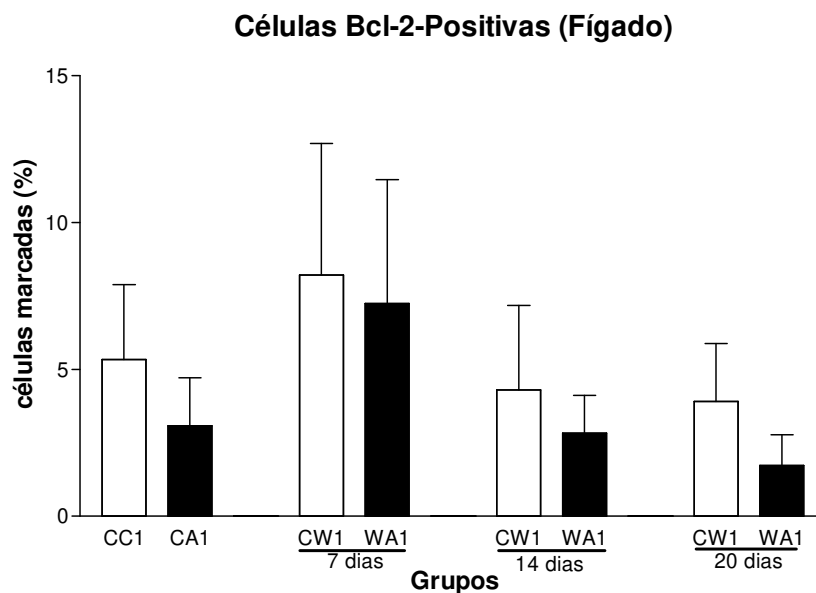


Figura 17. Expressão da proteína Bcl-2 determinada nos cortes histológicos do tecido hepático dos grupos experimentais controle e tratados com homogenizado de *Aloe vera* e mel ao longo do tempo de desenvolvimento tumoral. CC1 = Controle; CA1= Controle-*Aloe vera* e mel; CW1: Controle Tumor, WA1: Tumor - *Aloe vera*.

Os dados relativos à expressão de Bax e Bcl-2 dificilmente poderiam ser analisados separadamente, uma vez que o equilíbrio entre as duas proteínas modula a ocorrência de apoptose. É a relação entre a expressão de fatores pró-apoptóticos (no caso, Bax) e anti apoptóticos (no caso, Bcl-2) que ditam o rumo das células: morte ou sobrevivência. Portanto, analisando-se a relação Bax/Bcl-2, que indica susceptibilidade à apoptose, foi possível observar tendência a elevação no grupo CW1, no 14º e 20º dia de desenvolvimento tumoral, enquanto que em WA1, comparando-se ao grupo controle tratado com *Aloe vera* (CA1), essa tendência a elevação evidenciou-se apenas no final do desenvolvimento tumoral (Figura 18), sugerindo que a administração de *Aloe vera* e mel retardaria a ocorrência de apoptose, quando ainda no início do desenvolvimento tumoral, e conseqüentemente minimizaria o dano hepático decorrente do desenvolvimento tumoral, observado pelo aumento do índice de apoptose no 20º dia (Figura 18).

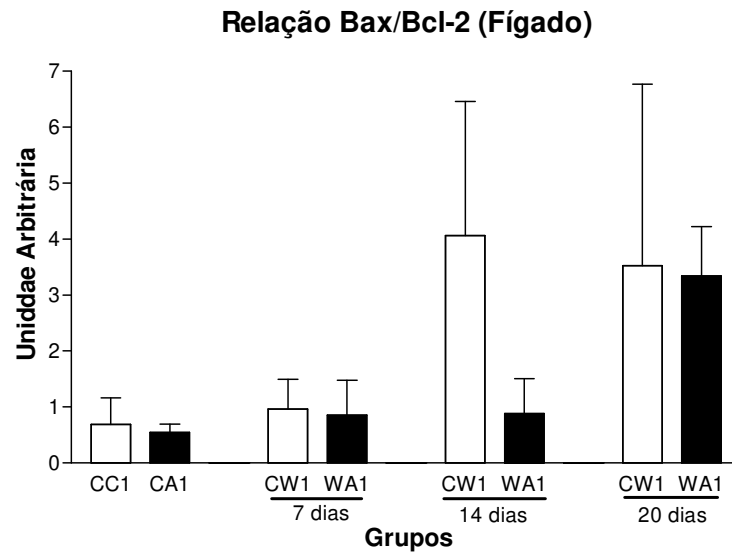


Figura 18. Relação Bax/Bcl-2 determinada através da expressão das proteínas Bax e Bcl-2 nos cortes histológicos dos fígados dos grupos experimentais controle e tratados com homogenizado de *Aloe vera* e mel ao longo do tempo de desenvolvimento tumoral. CC1 = Controle; CA1= Controle-*Aloe vera* e mel; CW1: Controle Tumor, WA1: Tumor - *Aloe vera*.

O fígado exerce papel central e de fundamental importância na metabolização de drogas e toxinas. Fatores humorais e imunológicos, liberados tanto pelo tumor quanto por tecidos hospedeiros provavelmente contribuem para o aparecimento de disfunções, lesões e sequelas hepáticas (SUZUKI *et al.*, 1993; FIELD *et al.*, 2008; WATCHORN *et al.*, 2001).

Fatores liberados no quadro de câncer diminuem a atividade de alguns tipos de citocromos, cujo papel é auxiliar na metabolização e eliminação de drogas, toxinas e outras substâncias (BERTZ & GRANNEMAN, 1997; RIVORY *et al.*, 2002). O TNF- α está dentre as citocinas cuja expressão está elevada em pacientes oncológicos, e de maneira análoga, em ratos portadores do carcinossarcoma de Walker 256 (MANTOVANI *et al.*, 2002; TISDALE, 2008; PERROUD *et al.*, 2006; REBECA *et al.*, 2008). Além disso, o TNF α é um dos principais mediadores endógenos de hepatotoxicidade, sendo capaz de provocar a apoptose dos hepatócitos (MANTOVANI *et al.*, 2004; LEIST *et al.*, 1995). Outro fator liberado pelo tecido tumoral, também capaz de provocar alterações metabólicas nos tecidos hospedeiros, é o PIF. No caso específico do fígado, PIF parece atuar de

maneira a alterar o metabolismo e a síntese protéica normal da célula hepática (WATCHORN *et al.*, 2001; TISDALE, 2004).

Os dados obtidos, no presente trabalho, sugerem que a administração de *Aloe vera* e mel aparentemente auxiliou na prevenção de dano hepático provocado pelo tumor, inicialmente aumentando a proliferação celular (Figuras 12 e 13), possivelmente visando melhoria na capacidade de metabolização hepática de fatores liberados pelo tumor, e, retardando a susceptibilidade a apoptose, via modulação na expressão das proteínas Bax e Bcl-2 (Figuras 14, 15, 16, 17 e 18). Combinando-se esses resultados pôde-se inferir que o tratamento realizado tendeu a atenuar a hepatotoxicidade caracteristicamente promovida por fatores imunológicos e humorais associados ao desenvolvimento do câncer. Os resultados observados podem ter sido provocados (1) diretamente, por ação de componentes da *Aloe vera* e do mel no próprio tecido hepático (KIM *et al.*, 2009, GBADEGESIN *et al.*, 2009), (2) indiretamente, por modular o crescimento tumoral, fazendo com que o tumor liberasse menor quantidade de fatores potencialmente ativos na circulação, ou ainda por (3) associação dos dois processos.

A análise integrada dos resultados obtidos para o tecido tumoral e tecido hepático quanto à proliferação (Ki-67-LI) e tendência à apoptose (relação Bax/Bcl-2) sugere modulação diferencial e oposta da *Aloe vera* e mel nestes dois tecidos, de modo a diminuir as taxas de proliferação e propiciar a apoptose no tecido tumoral enquanto manteve a capacidade proliferativa e retardou a tendência a apoptose no tecido hepático. Dessa maneira, em suma, *Aloe vera* e mel aparentemente atuaram contra o tecido tumoral enquanto preservaram os tecidos hospedeiros.

8.2 - Experimento 2: Avaliação da Eficácia Terapêutica do Homogeneizado de *Aloe vera* e mel:

8.2.1 - Ingestão e Ganho de Peso:

O monitoramento da ingestão de alimentos ao longo do experimento revelou, em todos os grupos experimentais (CC2, CW2, CWA2, AC2, AW2 e AWA2), aumento da quantidade média ingerida ao longo das primeiras semanas, condizente com a fase de crescimento dos animais seguida de platô, que se manteve até a semana da indução tumoral. A partir dessa fase, os grupos controle (CC2 e AC2) mantiveram a ingestão alimentar constante, enquanto que todos os grupos com tumor (CW2, CWA2, AW2 e AWA2) apresentaram queda na ingestão (Figura 19). A anorexia é um dos sintomas do quadro de fadiga relacionada ao câncer (RYAN *et al.*, 2007), e é desencadeada por fatores liberados pelo tumor, tais como as citocinas pró-inflamatórias (TISDALE 1997, 2005; ARGILES *et al.*, 2006; CONNAN *et al.*, 2007).

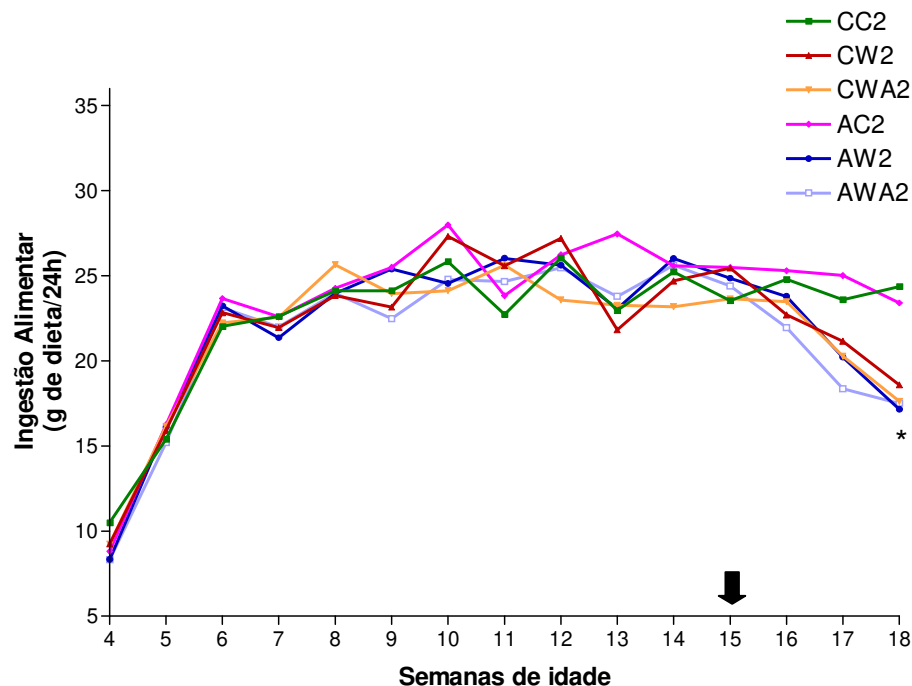


Figura 19. Quantidade média de alimento consumido diariamente por todos os grupos experimentais controle e tratados com *Aloe vera* e mel ao longo das semanas experimentais. CC2: Controle, CW2: Controle Tumor, CWA2: Controle - Tumor - *Aloe vera*, AC2: Controle - *Aloe vera*, AW2: - *Aloe vera* -Tumor, AWA2: *Aloe vera* -Tumor - *Aloe vera*. A seta indica a semana da indução de tumor, correspondendo a 21 dias de crescimento tumoral. * $P < 0,05$ comparando-se os animais portadores de tumor em relação ao respectivo controle (CC2 e CA2).

A ingestão de água, para todos os grupos experimentais (CC2, CW2, CWA2, AC2, AW2 e AWA2), também aumentou inicialmente e tendeu a um platô, porém, praticamente o perfil não se alterou após a indução de tumor (Figura 20).

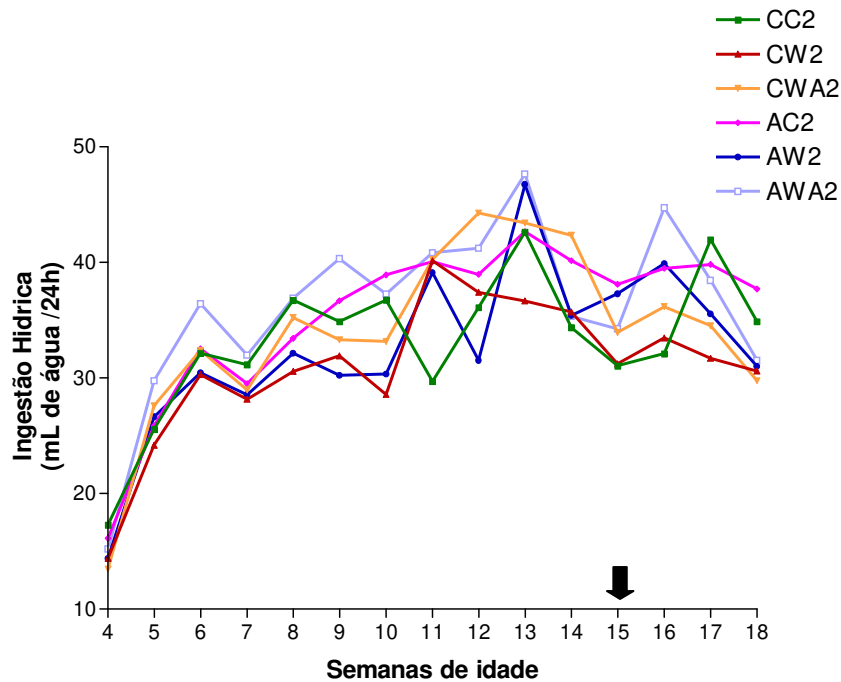


Figura 20. Quantidade média diária de água consumida por todos os grupos experimentais controle e tratados com *Aloe vera* e mel ao longo das semanas experimentais. Legenda vide Figura 19.

Os dados relativos ao ganho de peso demonstraram que os animais passaram a ganhar menos peso conforme atingiram a idade adulta, tendendo ao ganho de peso corporal entre 1 e 3g por dia. Porém, após a indução de tumor, ocorreu queda no ganho de peso, passando a ocorrer maior perda de peso nos grupos CW2 e AWA2 (Figura 21). Embora o desvio padrão seja elevado, pôde-se observar tendência dos grupos CWA2 e AW2 a manterem os valores de ganho de peso semelhantes aos dos controles CC2 e AC2. Essa observação reforça a hipótese de que, na vigência do câncer, além da anorexia (que provoca perda de peso devido à queda na ingesta), a caquexia também provoca perda de peso de maneira involuntária (mesmo se a ingestão estiver normal) devido à espoliação de reservas protéicas e lipídicas (TISDALE, 1997, 1999, 2009a; EMERY, 1999; RYAN *et al.*, 2007).

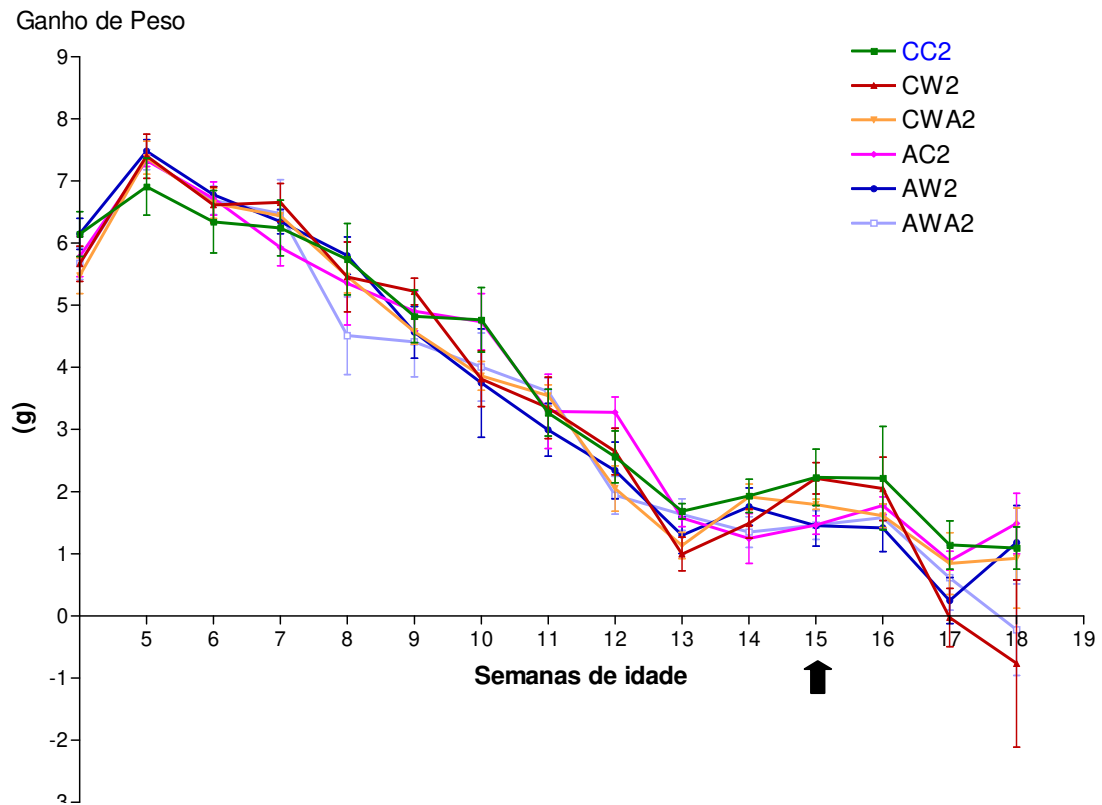


Figura 21. Ganho de peso médio (em gramas) dos grupos experimentais controle e tratados com Aloe vera e mel, com e sem implante tumoral, ao longo das semanas experimentais. Legenda vide Figura 19.

O ganho de peso corpóreo final, após 21 dias de desenvolvimento tumoral revelou perda de peso em todos os grupos com tumor, sendo esta mais acentuada e estatisticamente significativa nos grupos CW2, AW2 e AWA2 (Figura 22), corroborando a hipótese de maior espoliação nestes grupos e de possível efeito benéfico da administração de *Aloe vera* e mel de maneira terapêutica (grupo CWA2) na preservação do hospedeiro, como já observado para outros tratamentos alternativos e coadjuvantes (KWON *et al.*, 2007, RUSSELL & TISDALE, 2005; HILDENBRAND *et al.*, 1995; VICKERS & CASSILETH, 2001). A manutenção da integridade física do portador de tumor através da diminuição da espoliação e da caquexia é importante e necessária, pois aumentaria a sobrevida e possibilitaria ao paciente suportar o agressivo tratamento do câncer (DE WYS, 1986; TISDALE, 2000, 2009a).

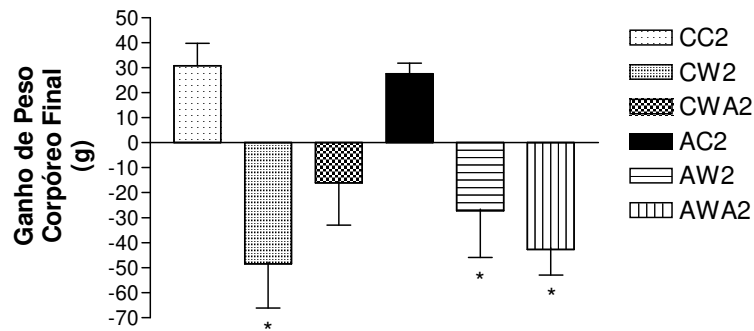


Figura 22. Porcentagem de ganho de peso médio final, após 20 dias de experimento ou implante tumoral, dos grupos experimentais controle e tratados com *Aloe vera* e mel, com e sem implante tumoral, ao longo das semanas experimentais. Legenda vide Figura 19. * $P < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa em relação ao respectivo controle.

8.2.2 – Análises Morfométricas:

Para avaliar o impacto dos diferentes tratamentos com homogeneizado de *Aloe vera* e mel, tanto sobre o tecido tumoral quanto sobre o hospedeiro, inicialmente foram realizadas análises morfométricas dos órgãos e tecidos coletados.

A porcentagem de peso relativo da carcaça foi significativamente menor em todos os grupos com tumor (CW2, CWA2, AW2 e AWA2) em relação aos respectivos controles (CC2 e AC2; Figura 23), o que aponta para perda de massa corporal devido à espoliação induzida pelos efeitos do crescimento do tumor (SAINI *et al.*, 2006).

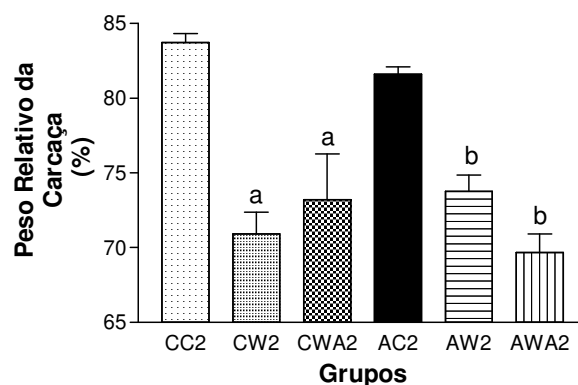


Figura 23. Porcentagem de peso relativo médio da carcaça dos grupos experimentais controle e tratados com *Aloe vera* e mel, com e sem implante tumoral. Legenda vide Figura 19. a $P < 0,05$ diferença estatisticamente em relação ao grupo CC2; b $P < 0,05$ diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo AC2, segundo método Análise de Variância (ANOVA).

Corroborando com o quadro de câncer-caquexia apresentado, embora não tenha sido estatisticamente significativo, verificou-se decréscimo do peso relativo do músculo gastrocnêmio em todos os grupos portadores de tumor (CW2, CWA2, AW2 e AWA2) em relação aos respectivos controles, porém essa queda foi mais acentuada no grupo que não recebeu tratamento com homogeneizado de *Aloe vera* e mel em nenhum período experimental (CW2) (Figura 24). Esses dados sugerem que provavelmente agentes específicos contidos no homogeneizado *Aloe vera* e mel puderam auxiliar na manutenção da musculatura esquelética, combatendo a caquexia.

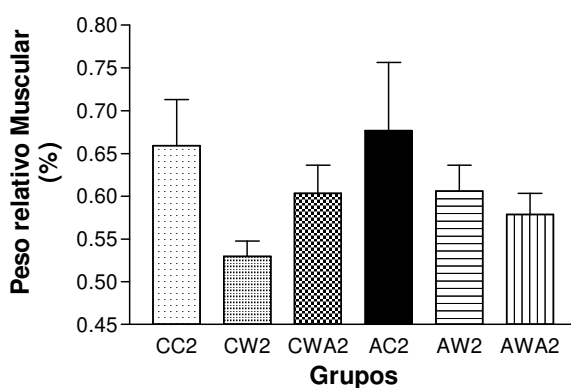


Figura 24. Porcentagem de peso relativo médio do músculo gastrocnêmio dos grupos experimentais controle e tratados com *Aloe vera* e mel, com e sem implante tumoral. Legenda vide Figura 19. Sem diferença estatisticamente significativa, segundo método Análise de Variância (ANOVA).

A pronunciada perda de peso corpóreo (Figura 22), decréscimo no peso relativo da carcaça (Figura 23) e do músculo gastrocnêmico (Figura 24), são comumente promovidos por fatores indutores de caquexia liberados pelo tumor, entre eles, TNF- α , PIF, fator de mobilização de lipídios, além de catecolaminas liberadas pela medula da adrenal em decorrência ao estresse gerado pelo câncer (TISDALE 2009b; AGUSTSSON *et al.*, 2007; JOCKEN *et al.*, 2008). Esses fatos evidenciam a presença do quadro de caquexia associada ao câncer, mais severo no grupo CW2, e da espoliação de reservas, sobretudo das fontes ricas em proteínas (TISDALE 1999, 2009a). O aparente efeito protetor dessas reservas promovido pela administração de *Aloe vera* e mel, sobretudo após a indução tumoral (CWA2), é essencial para a sobrevivência do hospedeiro, uma vez que em pacientes, a perda acima de 30% da massa corporal normal é invariavelmente fatal (BRENNAN, 1986).

Observou-se elevação do peso relativo do fígado em todos os grupos com tumor (CW2, CWA2, AW2 e AWA2) e no grupo Controle - *Aloe vera* (AC2), sendo este aumento estatisticamente significativo em CW2 (Figura 25). A hepatomegalia provavelmente reflete em dois aspectos principais: acúmulo de proteína C reativa, que é sintetizada no fígado durante a fase inflamatória aguda, ou edema, ambos condizentes com a patologia do câncer, especialmente em estágios avançados (MORRIS-STIFF *et al.*, 2008 e HONNOR, 2008).

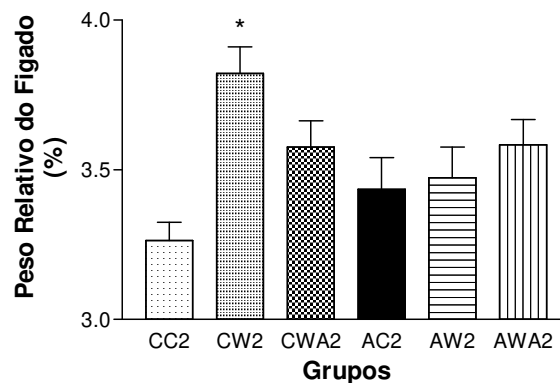


Figura 25. Porcentagem de peso relativo médio do fígado dos grupos experimentais controle e tratados com *Aloe vera* e mel, com e sem implante tumoral,. Legenda vide Figura 19. * $P < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa em relação ao respectivo controle.

Quanto ao peso relativo do coração, houve manutenção do peso similar ao controle em todos os grupos experimentais (Figura 26).

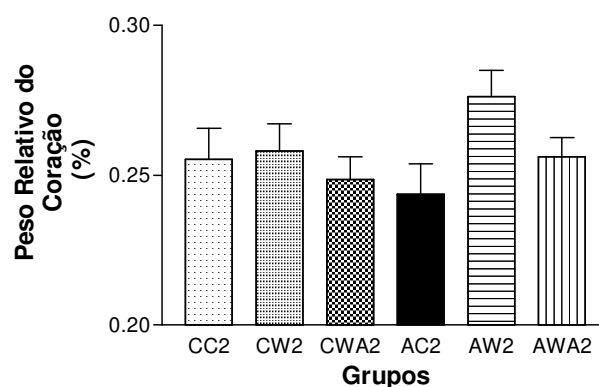


Figura 26. Porcentagem de peso relativo médio do coração dos grupos experimentais controle e tratados com *Aloe vera* e mel, com e sem implante tumoral,. Legenda vide Figura 19. Sem diferença estatisticamente significativa, segundo método Análise de Variância (ANOVA).

Os fatores mediadores de caquexia liberados pelo tumor (tais como o PIF) modulam a espoliação protéica especificamente na musculatura esquelética, contudo não atuam sobre a musculatura cardíaca (LORITE *et al.*, 2001; TISDALE 2009b), o que explica a invariabilidade entre os grupos experimentais em relação ao peso relativo do coração (Figura 26).

Observou-se esplenomegalia significativa em todos os grupos com tumor (CW2, CWA2, AW2 e AWA2) (Figura 27).

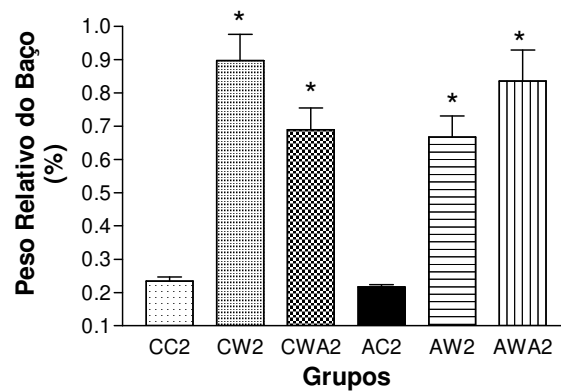


Figura 27. Porcentagem de peso relativo médio do baço dos grupos experimentais controle e tratados com Aloe vera e mel, com e sem implante tumoral,. Legenda vide Figura 19. * $P < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa em relação ao respectivo controle.

A esplenomegalia está relacionada com a resposta imunológica já que o baço agrega linfócitos e é um dos sítios onde ocorre a apresentação de antígenos (LIU *et al.*, 2008). Porém há evidências de que a ativação crônica do sistema imune do hospedeiro, promovida pelo tumor, estaria envolvida na gênese e manutenção do quadro de câncer-caquexia (MANTOVANI *et al.*, 1998, 2004). Portanto, o aumento do baço não significa maior reatividade do sistema imunológico contra o tumor, e sim a caracterização dos efeitos tumorais principalmente relacionados à secreção de citocinas pro-inflamatórias e relacionadas ao processo caquético (TISDALE 1997, 2005; CONNAN *et al.*, 2007). As citocinas/fatores ativos, que os tecidos hospedeiros e/ou tumor liberam, podem aumentar a proliferação de células, para que haja síntese de citocinas, mas que não necessariamente atuem contra o tecido tumoral. Não há apresentação de antígenos uma vez que o tumor imunologicamente não é

reconhecido, mas há predomínio dos seus efeitos espoliativos devido às respostas dos tecidos do hospedeiro em secretar citocinas (ARGILES *et al.*, 2006).

Os dados obtidos quanto à quantidade de gordura perirrenal revelaram tendência à queda em CW2 e AWA2, enquanto que os grupos CWA2 e AW2 mantiveram valores similares ao controle. O grupo AC2 apresentou maior acúmulo de gordura perirrenal que o controle CC2 (Figura 28).

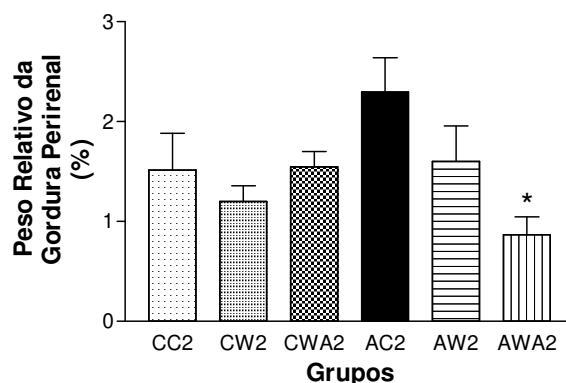


Figura 28. Porcentagem de peso relativo médio do depósito de gordura perirrenal dos grupos experimentais controle e tratados com *Aloe vera* e mel, com e sem implante tumoral,. Legenda vide Figura 19. * $P < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa em relação ao respectivo controle.

A quantidade de reserva lipídica também é muito importante para se avaliar o impacto tumoral sobre o hospedeiro com relação à espoliação e caquexia (TISDALE 2009b). O estresse causado pelo desenvolvimento tumoral aumenta a liberação de catecolaminas, que são capazes de provocar lipólise (AUGUSTSSON *et al.*, 2007; JOCKEN *et al.*, 2008). Além disso, tumores que provocam caquexia liberam fatores de mobilização de lipídios capazes de promover liberação da gordura armazenada nos adipócitos (HOLLANDER *et al.*, 1986; BECK *et al.*, 1990; BING *et al.*, 2006), diminuindo as reservas de gordura corporal e liberando ácidos graxos na circulação sanguínea, possibilitando assim utilização destes pelo tumor ou fornecimento de energia para outros órgãos e tecidos, além disso, também após conversão dos ácidos graxos livres em corpos cetônicos pelo fígado, podem ser utilizados pelo cérebro (TISDALE 2009b). Possivelmente, a administração de *Aloe vera* e mel de maneira terapêutica (CWA2), possibilitou auxiliar na preservação de reserva lipídica, o que já foi observado para outros tratamentos adjuvantes (RUSSELL & TISDALE, 2005).

O tamanho dos rins manteve-se semelhante em todos os grupos experimentais, não indicando, portanto, falência ou edema renal nos animais com tumor (Figura 29).

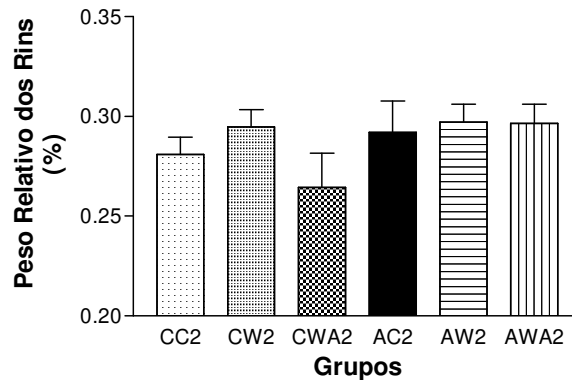


Figura 29. Porcentagem de peso relativo médio dos rins dos grupos experimentais controle e tratados com *Aloe vera* e mel, com e sem implante tumoral. Legenda vide Figura 19.

Observou-se também aumento no peso relativo das glândulas adrenais em todos os grupos com tumor (CW2, CWA2, AW2 e AWA2) em relação aos respectivos controles, porém o aumento foi menos pronunciado e não significativo em CWA2 (Figura 30).

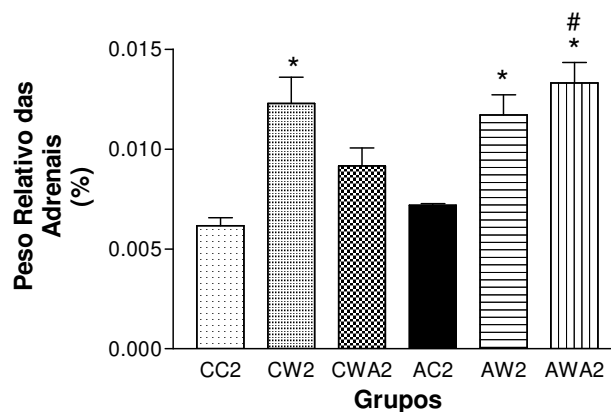


Figura 31. Porcentagem de peso relativo médio das adrenais dos grupos experimentais controle e tratados com *Aloe vera* e mel, com e sem implante tumoral. Legenda vide figura 19. * $P < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa em relação ao respectivo controle; # $P < 0,05$ diferença significativa em relação ao CWA2.

Em situações de estresse fisiológico crônico, como o provocado pelo tumor, ocorre hipertrofia das glândulas adrenais e aumento da produção de catecolaminas e de cortisol (DROTT *et al.*, 1988). Enquanto as catecolaminas participam do processo de mobilização das reservas protéicas e lipídicas

(AGUSTSSON *et al.*, 2007; JOCKEN *et al.*, 2008; TISDALE 2009b) acentuando o quadro de caquexia, o cortisol, além de participar do processo de espoliação (TISDALE 2009b) apresenta atividade imunossupressora (ASHWELL *et al.*, 2000). O possível efeito modulatório exercido pela administração de *Aloe vera* e mel, após a indução tumoral (CWA2), (Figura 31), seria benéfico, refletindo possivelmente em diminuição da espoliação tecidual muscular, da gordura perirenal e da carcaça (Figuras 22, 23, 24 e 28).

O impacto do tratamento com o homogeneizado de *Aloe vera* e mel sobre o tecido tumoral pôde ser inicialmente observado pelas diferenças macroscópicas entre os tumores dos diferentes grupos experimentais (Figura 32), bem como pela diferença na evolução do crescimento tumoral, acessada através do peso calculado do tumor (Figura 33), e ainda através do peso relativo do tumor no dia do sacrifício (vigésimo primeiro dia de implante tumoral), onde observou-se significativa redução do peso no grupo CWA2 quando comparado aos demais grupos, em especial CW2 e AWA2 (Figura 34).



Figura 32. Exemplos de tumores coletados de animais de diferentes grupos experimentais. CW2: Controle Tumor, CWA2: Controle -Tumor - *Aloe vera*, AW2: - *Aloe vera* -Tumor, AWA2: *Aloe vera* -Tumor - *Aloe vera*.

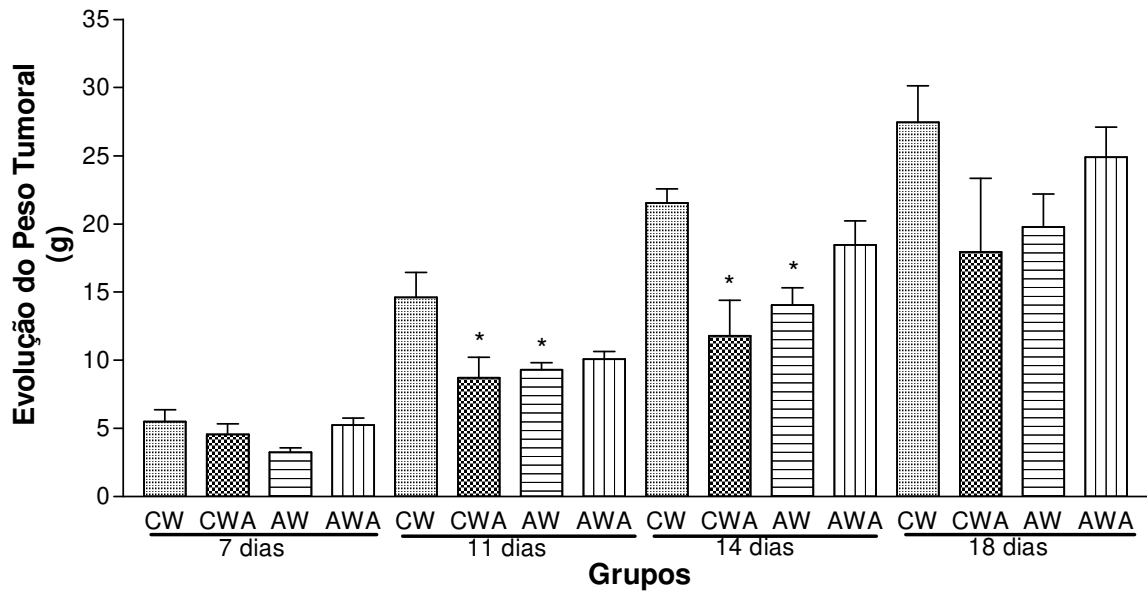


Figura 33. Peso calculado médio (g) do tumor dos grupos experimentais controle e tratados com *Aloe vera* e mel, ao longo do período de evolução tumoral. Legenda vide Figura 32. * $P < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa segundo ANOVA (feito para o 7º, 11º, 14º e 18º dia separadamente), entre os grupos WA2 e AW2 em relação ao CW2.

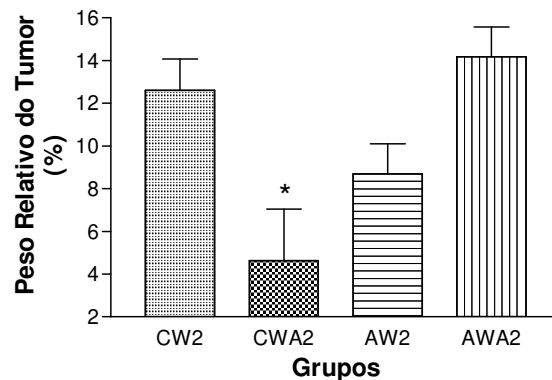


Figura 34. Porcentagem de peso relativo final do tumor dos grupos experimentais controle e tratados com *Aloe vera* e mel. CW2: Controle Tumor, CWA2: Controle -Tumor - *Aloe vera*, AW2: - *Aloe vera* -Tumor, AWA2: *Aloe vera* -Tumor - *Aloe vera*. * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o grupo CWA2 em relação a CW2 e AWA2.

Os tumores do grupo controle-tumor não tratado (CW2; análise macroscópica observada na Figura 32) apresentavam-se geralmente bem desenvolvidos, irrigados e com aderências detectáveis no peritônio, gordura perirrenal e muitas vezes no músculo superior da pata posterior direita, além de apresentar metástases paravertebrais, axilares e inguinais com elevada frequência. Já os tumores do grupo tratado com *Aloe vera* e mel após a indução tumoral (CWA2), apresentaram-se em geral menos

desenvolvidos, encapsulados, com extensas áreas de necrose, menor irrigação e aderência. Os tumores do grupo AW2, que recebeu *Aloe vera* e mel apenas anteriormente à indução tumoral, em geral possuíam características intermediárias (irrigação, necrose e adesão aos tecidos adjacentes) comparativamente aos tumores dos grupos CW2 e CWA2. Já o grupo AWA2, que recebeu *Aloe vera* e mel durante todo o período experimental, também apresentou tumores bem desenvolvidos e com aderência, porém em alguns casos, com menor vascularização.

Algumas das diferenças observadas, especialmente entre o grupo CW2 e CWA2, podem ser associadas a processos aparentemente modulados pela *Aloe vera* e mel, como menor proliferação e maior tendência à apoptose, como observado no primeiro experimento (Figuras 6 e 11). Na literatura pertinente, já foi observada ação tanto da *Aloe vera*, quanto do mel no controle da evolução tumoral e surgimento de metástases (GRIBEL' & PASHINSKII, 1986, 1990; HAMZAOGLU *et al.*, 2000, AKEV *et. al*, 2007, ORSOLIC *et al.*, 2004).

Analisando-se a evolução do tamanho tumoral ao longo do período experimental (Figura 33), calculado a partir das três medidas lineares do tumor, foi possível observar diferenças significativas no tamanho médio que o tumor dos grupos CWA2 e AW2 alcançaram no décimo primeiro e décimo quarto dia, quando comparados ao controle CW2 do mesmo dia (Figura 33). O crescimento tumoral para os grupos CWA2 e AW2 foi, nas etapas iniciais e intermediárias da evolução tumoral, mais lento do que o crescimento dos tumores controles CW2: o peso calculado do tumor para o grupo CW2 chegou a triplicar do sétimo para o décimo primeiro dia, confirmando a evolução exponencial do carcinossarcoma de Walker 256, enquanto que para os grupos CWA e AW, no mesmo período, houve apenas aumento de cerca de duas vezes. No décimo oitavo dia, embora a diferença não seja mais estatisticamente significativa, ainda pôde-se observar tendência a apresentação de menor tamanho tumoral nos grupos CWA2 e AW2, enquanto que os tumores do grupo AWA2 tenderam a apresentar tamanho similar ao do grupo CW2. O desvio padrão relativamente alto apresentado por CWA2 no

décimo quarto e décimo oitavo dia foi devido ao fato de que 2 animais deste grupo apresentaram involução do tumor nesse período.

A menor taxa de crescimento apresentada e, conseqüentemente, menor tamanho do tumor também pôde ser relacionada à menor proliferação e maior susceptibilidade à apoptose dos tumores dos animais tratados com *Aloe vera* e mel (WA1), dados observados no primeiro experimento (Figuras 6 e 11). Possivelmente, ainda houve modulação do crescimento tumoral no grupo tratado apenas previamente com *Aloe vera* e mel (AW2), dados observados nas duas primeiras semanas após a indução tumoral, sendo que essa modulação, posteriormente, tendeu a ser suprimida. Paradoxalmente, o grupo AWA2 apresentou apenas tendência a menor peso calculado do tumor no décimo primeiro dia, tendendo a apresentar valores similares ao do grupo CW2, nos dias subseqüentes.

Vários trabalhos já demonstraram que *Aloe vera*, mel ou alguns de seus componentes poderiam atuar de maneira inibitória do crescimento tumoral ou reduzir o tamanho do tumor *in vivo* (GRIBEL' & PASHINSKII, 1986, 1990; SWELLAM *et al.*, 2003), além de modular a proliferação celular e promover apoptose especialmente em experimentos *in vitro* (SWELLAM *et al.*, 2003; ACEVEDO-DUNCAN *et al.*, 2004; LIN *et al.*, 2006).

A análise da porcentagem de peso relativo do tumor após vinte e um dias de implante tumoral (Figura 34) revelou diferença significativa entre os tumores de animais tratados com *Aloe vera* (CWA2) e mel em relação aos tumores de animais não tratados (CW2). Os animais tratados apenas previamente com *Aloe vera* e mel (AW2) apresentaram valores de porcentagem de peso relativo do tumor intermediários entre os tumores dos grupos CWA2 e CW2, enquanto que o grupo AWA2 apresentou valores próximos ao CW2 (Figura 34). Esses dados reforçam a hipótese de que o extrato de *Aloe vera* e mel inibiu o crescimento tumoral, especialmente quando administrado de maneira

terapêutica, mas ressalta-se que a administração a longo prazo e ininterrupta do extrato de *Aloe vera* e mel aos animais (AWA2), não foi eficiente no controle do crescimento tumoral.

Os resultados obtidos foram condizentes com dados da literatura, onde demonstrou-se que a utilização de terapias coadjuvantes beneficiaria a carcaça do hospedeiro (Figuras 22, 23, 24 e 28) (KWON *et al.*, 2007), que *Aloe vera*, mel ou seus componentes atuam sobre o tumor, inibindo seu crescimento e reduzindo a massa tumoral, como verificado nas Figuras 33 e 34 (GRIBEL' & PASHINSKII, 1986; PENG *et al.*, 1991 e MERRIAM *et al.*, 1996; SWELLAM *et al.*, 2003), mostrando significativa redução do crescimento e menor tamanho tumoral a partir do décimo primeiro dia de implante e menor peso relativo do tumor ao final da evolução tumoral (21 dias).

8.2.3 – Composição corpórea:

A análise da porcentagem de água total da carcaça dos animais dos diferentes grupos experimentais revelou tendência ao acúmulo de água em todos os grupos com tumor, embora estatisticamente significativa apenas entre o grupo AWA2 em relação ao respectivo controle (AC2). Foi possível observar tendência a menor acúmulo de água nos grupos CWA2 e AW2 em relação ao controle-tumor CW2 (Figura 35A).

A partir dos dados obtidos em relação à porcentagem de gordura total da carcaça, foi possível observar queda na reserva de gordura em CW2 e AW2, embora não significativa, quando comparada ao grupo controle CC2 (Figura 35B). Também, verificou-se tendência de aumento dessa reserva no grupo controle AC2 e a porcentagem de gordura corpórea no grupo CWA2 foi similar ao dos controles CC2 e AC2. A porcentagem de gordura no grupo AWA2 apresentou valores intermediários aos dos grupos CC2 e CW2 (Figura 35B).

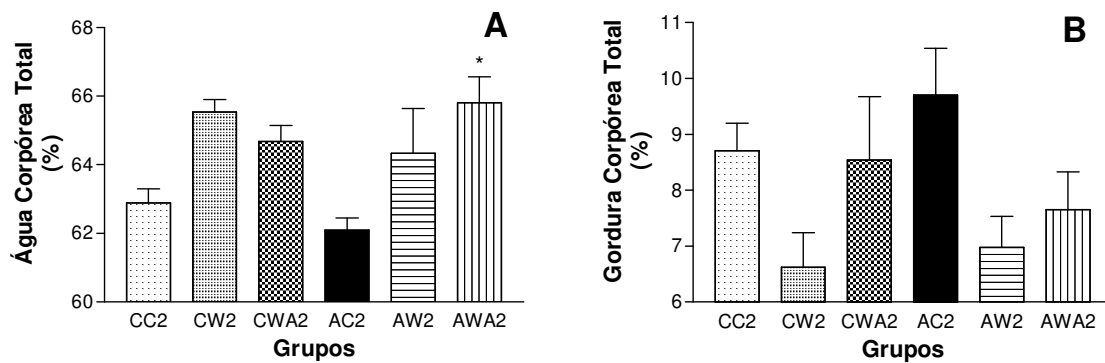


Figura 35. Porcentagem de água total (A) e de gordura total (B) da carcaça dos animais dos grupos experimentais controle e tratados com *Aloe vera* e mel, com e sem inoculação do tumor. Legenda vide Figura 19. * $P < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa em relação ao respectivo controle (AC2).

O aumento na porcentagem de água contida na carcaça indica edemaciação, quadro comum na patologia do câncer, especialmente em estágios mais avançados, fato decorrente ao desbalanço entre a filtração do plasma e a drenagem linfática (MORTIMER, 1998). O estabelecimento de edema crônico generalizado, em portadores de tumores que provocam caquexia, dá-se especialmente devido à queda na concentração de albumina plasmática (STEHLER *et al.*, 1997; TISDALE 2009b).

Os dados obtidos quanto à quantidade de gordura presente na carcaça (Figura 35B), bem como peso relativo da reserva de gordura perirrenal (Figura 28) estão condizentes com o quadro de câncer-caquexia, uma vez que pacientes com câncer/caquexia chegam a perder 85% de suas reservas corporais de gordura (FEARON, 1992; TISDALE 2009b).

Como já mencionado, tumores que provocam caquexia liberam fator de mobilização de lipídios, além de outras citocinas que induzem alterações metabólicas e respostas no hospedeiro que levam à espoliação de reservas (HOLLANDER *et al.*, 1986; BECK *et al.*, 1990; BING *et al.*, 2006). A hipertrofia da glândula adrenal (Figura 31), por exemplo, possivelmente indica hipersecreção de catecolaminas e corticosteroídes, ambos com atuação na degradação de reservas protéicas e lipídicas (TISDALE 2009b; AUGUSTSSON *et al.*, 2007; JOCKEN *et al.*, 2008).

A síndrome câncer-caquexia resulta justamente da ação dos fatores circulantes produzidos pelo tumor ou pelo sistema imune do hospedeiro sobre órgãos e tecidos-alvo (entre eles musculatura

esquelética, fígado e tecido adiposo). Várias citocinas pró-inflamatórias, incluindo as interleucinas IL-1, IL-6, e o TNF- α parecem participar da patogênese da caquexia associada ao câncer em humanos (MOLDAWER *et al.*, 1987; STRASSMANN *et al.*, 1992; BUSBRIDGE *et al.*, 1989; GELIN *et al.*, 1991; MCLAUGHLIN *et al.*, 1992; ARGILES *et al.*, 2006; TISDALE 2008, 2009a, 2009b). A presença de fatores lipolíticos e proteolíticos derivados do tumor, na circulação e o aumento do gasto energético também conduzem ao quadro de câncer-caquexia (TISDALE 2000, 2009b).

A administração de *Aloe vera* e mel, especialmente após a indução tumoral (CWA2) aparentemente beneficiou o hospedeiro, uma vez que pareceu conter os processos associados à caquexia, diminuindo a espoliação e preservando as reservas lipídicas (Figuras 28 e 35B). A aparente diminuição na espoliação de gorduras observada poderia ser atribuída à menor liberação dos fatores indutores de caquexia pelo tumor, uma vez que o peso relativo deste apresentou-se diminuído especialmente no grupo CWA2 (Figura 34), além de menor hipertrofia da glândula adrenal (Figura 31) e conseqüentemente, menor quantidade de catecolaminas e corticosteroídes na circulação para atuar na mobilização de lipídios.

8.2.4 – Análises Bioquímicas Séricas:

Os efeitos dos diferentes tratamentos com homogeneizado de *Aloe vera* e mel sobre o hospedeiro portador de tumor foram avaliados através de análises bioquímicas séricas para determinação da concentração sérica de proteína total, albumina e globulina e concentração de glicose, apresentados nas Figuras 36 A-C e 37.

O teor de proteína total sérica (que corresponde ao total de frações de albumina e globulinas) caiu em todos os grupos com tumor (CW2, CWA2, AW2 e AWA2) em relação aos respectivos controles (CC2 e AC2) (Figura 36A). Em relação à albumina sérica, também observou-se decréscimo

nas concentrações em todos os grupos com tumor (CW2, CWA2, AW2 e AWA2) em relação aos controles (CC2 e AC2), porém esse decréscimo foi ligeiramente menor em CWA2 e AW2 (Figura 36B). A albumina é a proteína sérica responsável pela manutenção da pressão coloidosmótica, portanto, a queda na sua concentração provocaria extravasamento de líquido do compartimento vascular para o interstício tecidual, causando edema, situação comum no câncer (STEHLÉ *et al.*, 1997; TISDALE 2009b). As globulinas proporcionam indicativo do grau de ativação da resposta imune humoral, que é mediada por imunoglobulinas liberadas pelos plasmócitos (linfócitos B diferenciados) (AZEVEDO & ARAÚJO 1993). Outros tipos de globulinas são produzidas pelo fígado durante a fase aguda (TISDALE 2009b). Assim, pôde-se observar que a concentração de globulinas (Figura 36C) no grupo AW2, que recebeu o homogeneizado de *Aloe vera* e mel até a indução de tumor, manteve-se próxima a dos controles (CC2 e AC2). Enquanto que no grupo controle-tumor (CW2) a concentração de globulinas elevou-se, porém não significativamente. Já nos grupos que receberam *Aloe vera* e mel durante o desenvolvimento tumoral (CWA2 e AWA2), houve tendência a elevação ainda mais pronunciada que no grupo CW2 (Figura 36C).

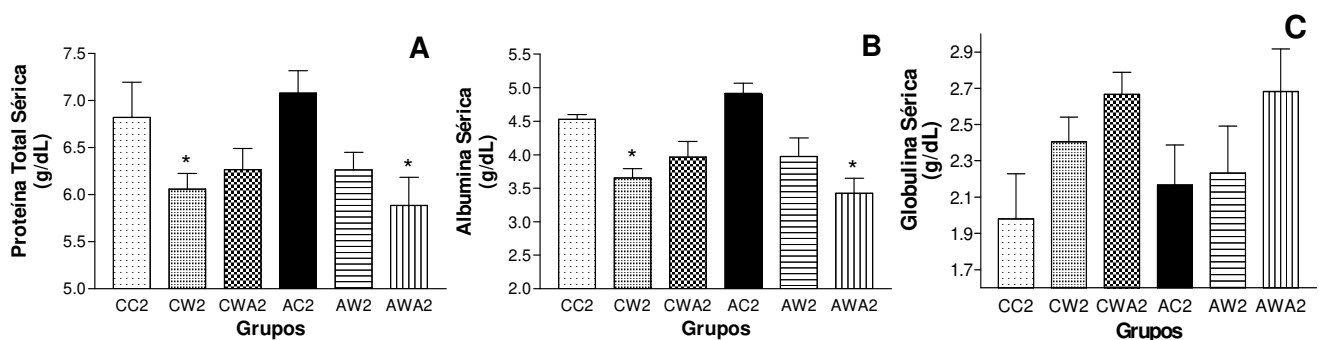


Figura 36. Concentração de proteína total (A), albumina (B) e globulina (C) sérica dos grupos experimentais controle e tratados com *Aloe vera* e mel, com e sem inoculação do tumor.. Legenda vide Figura 19. * $P < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa em relação ao respectivo controle.

Os resultados observados estão de acordo com a literatura pertinente, onde demonstram que alterações nas concentrações de proteínas plasmáticas são comuns em alguns tipos de câncer,

especialmente naqueles capazes de induzir caquexia (STEHLÉ *et al.*, 1997; CHOJKIER, 2005; TISDALE 2009b).

Quedas na concentração de albumina sérica são prevalentes em pacientes com câncer. Inicialmente, citocinas liberadas pelo tumor (entre elas TNF- α), conduzem à resposta de fase aguda (alterações na síntese protéica hepática), priorizando a produção de proteínas de fase aguda (tais como proteína C reativa, fibrinogênio e alguns tipos de globulinas) em detrimento à síntese de albumina (TISDALE 2009b). Em tumores que provocam caquexia, ocorre ainda queda na síntese e aumento da espoliação de albumina, processos mediados pelo PIF e TNF- α , possibilitando fornecimento de substratos necessários ao crescimento do tumor (STEHLÉ *et al.*, 1997; CHOJKIER, 2005; TISDALE 2009b).

As concentrações de albumina sérica observadas reforçam, ainda, a hipótese de que o surgimento de edema nos animais dos diferentes grupos foi devido a alterações nos níveis de albumina sérica, já que foi possível observar maior porcentagem de água corpórea (Figura 35A) justamente nos grupos (CW2 e AWA2) que apresentaram as maiores quedas nos níveis de albumina sérica (Figura 36B).

A partir destes resultados é possível sugerir que a administração de *Aloe vera* e mel, antes (AW2) ou após a indução de tumor (CWA2), poderia proporcionar a manutenção dos níveis de albumina sérica mais próximos ao normal, mantendo sua produção hepática ou diminuindo a espoliação, controlando assim, indiretamente, o acúmulo de água e o surgimento de edema.

Com base nos resultados obtidos, não foi possível determinar se o aumento das globulinas no plasma foi em decorrência à resposta de fase aguda ou à resposta específica contra o tumor. No entanto, pôde-se supor que essas respostas imunológicas poderiam estar ativadas de maneiras diferentes entre os grupos, uma vez que as concentrações de globulinas tenderam a ser diferentes

entre alguns dos grupos com tumor (CWA2 e AWA2 em relação à CW2, Figura 36C). Na literatura, já foram demonstradas inúmeras ações imunoestimulatórias de *Aloe sp.*, mel e seus componentes (LEE *et al.*, 2001; REYNOLDS & DWECK, 1999; JAGANATHAN & MANDAL, 2009a, LISSONI *et al.*, 2009).

Em suma, a análise das proteínas séricas sugere que *Aloe vera* e mel, especialmente quando administrados apenas antes da indução de tumor (AW2) ou após essa indução (CWA2) podem ter atuado em processos que manteriam as concentração de albumina similares aos dos controles (Figura 36B), auxiliando assim no controle do surgimento de edema e grau de edemaciação (Figura 35A), e ainda, possivelmente, aumentando a produção de globulinas (Figura 36C).

A glicose sérica foi reduzida em todos os grupos com tumor (CW2, CWA2, AW2, AWA2) em relação aos controles CC2 e AC2 (Figura 37). Esse decréscimo na glicemia estaria associado ao estado pré-agônico em que se encontravam os animais portadores de tumor.

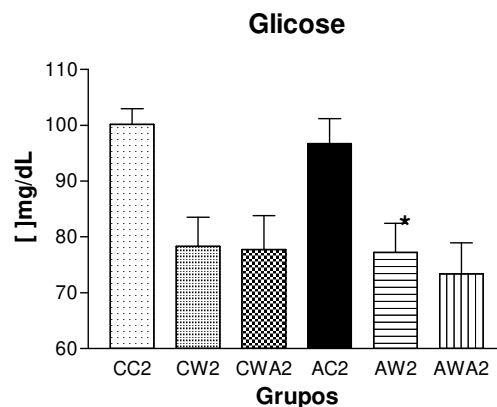


Figura 37. Concentração de glicose sérica dos grupos experimentais controle e tratados com *Aloe vera* e mel, com e sem inoculação do tumor. Legenda vide Figura 19. * $P < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa em relação ao controle CC2, segundo método Análise de Variância (ANOVA).

A hipoglicemia observada em indivíduos com câncer, e de maneira análoga, em animais-modelo, deve-se ao fato de que o consumo e a metabolização da glicose pelo tecido tumoral são extremamente elevados (WARBURG *et al.*, 1924; WARBURG 1956a, 1956b). No caso específico de tumores que provocam caquexia, tais como o tumor de Walker 256, há maior mobilização de substratos neoglicogênicos (lactato, glicerol e alanina) e maior produção de glicose pelo fígado

devido à ação de fatores mediadores de caquexia (TISDALE 2004, 2009b; WATCHORN, *et al.*, 2001), conseqüentemente há menor secreção de insulina, favorecendo assim a gliconeogênese, culminando em ciclo energético negativo (FERNANDES *et al.*, 1990). Assim, mesmo havendo elevada produção de glicose, a sua utilização pelas células tumorais é tão elevada que o resultado final é a hipoglicemia (TAYEK, 1992; GATENBY & GILLIES, 2004).

8.2.5 - Avaliação da Atividade Celular, Estresse Oxidativo e Enzimas Antioxidantes:

Outros fatores e mecanismos com papel central no desenvolvimento da síndrome câncer-caquexia estão associados a processos de estresse oxidativo, gerado por diversos mecanismos (MANTOVANI *et al.*, 2004). Entre esses mecanismos estão as próprias alterações no metabolismo energético que levam à geração e acúmulo de espécies reativas de oxigênio; a ativação crônica não-específica do sistema imune e, conseqüente, liberação de citocinas pró-inflamatórias que aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio (MANTOVANI *et al.*, 1998, 2004). Já foi demonstrado que TNF- α promove aumento na espoliação do músculo esquelético, em modelos de câncer-caquexia, provavelmente através da indução de estresse oxidativo (BUCK & CHOJKIER, 1996).

Para avaliar-se o impacto dos diferentes tratamentos com o homogeneizado de *Aloe vera* e mel sobre o estresse oxidativo dos tecidos do hospedeiro e sobre o tecido tumoral, avaliou-se a atividade de enzimas relacionadas como glutathione-S-transferase, superóxido dismutase e catalase, correlacionando-se com a atividade celular (atividade da enzima fosfatase alcalina) e concentração de MDA, produto originado da peroxidação de lipídeos, geralmente relacionados à membrana celular.

Pudemos observar que a concentração de proteína no tecido hepático foi mais elevada nos grupos (com tumor ou não) que receberam o homogeneizado de *Aloe vera* e mel por períodos prolongados (AC2, AW2 e AWA2) em relação ao controle CC2 (Figura 38A). Situação semelhante,

porém não tão pronunciada, pôde ser observada quando se analisa o teor de proteína cardíaca: os grupos que receberam o homogeneizado de *Aloe vera* e mel por períodos prolongados (AC2, AW2 e AWA2) também tiveram aumento na concentração de proteína do miocárdio, quando comparados ao controle CC2 (Figura 38B). Porém este aumento refletiu em elevação do peso relativo do coração apenas no grupo AW2 (Figura 26). Observou-se que a concentração de proteína do músculo gastrocnêmio não diferiu entre os grupos experimentais, com exceção da queda não significativa sofrida por AC2 (Figura 38C).

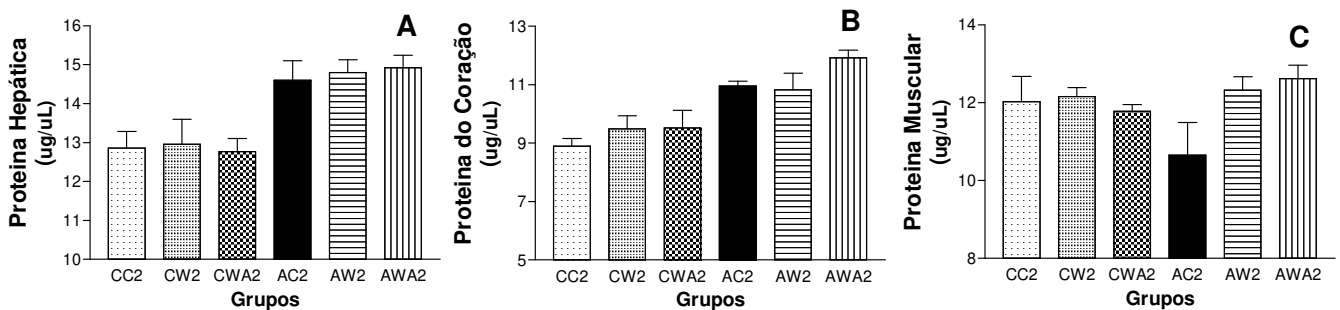


Figura 38. Concentração de proteína hepática (A), do coração (B) e muscular (C) total dos grupos experimentais controle e tratados com *Aloe vera* e mel, com e sem inoculação do tumor. Legenda vide Figura 19. * $P < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa entre AWA2 e CC2.

Embora a concentração de proteína hepática em CW2 (Figura 38A) tenha se mantido similar a do controle CC2, ocorreu hepatomegalia neste grupo (Figura 25), o que reforça a hipótese de edemaciação neste órgão, mascarando assim, possivelmente, aumento na produção hepática de proteínas de fase aguda (proteína C reativa, fibrinogênio e determinados tipos de globulinas), comum em determinadas situações patológicas, entre as quais, o câncer (STEPHENS *et al.*, 2008; MCMILLAN 2009; TISDALE 2009b). Em contrapartida, embora tenha ocorrido aumento da concentração protéica no fígado em AC2, AW2 e AWA2 (Figura 38A), houve apenas tendência a aumento da massa hepática nestes grupos (Figura 25). Uma vez que diversas pesquisas já demonstraram que nem *Aloe vera* e nem o mel apresentaram hepatotoxicidade quando administrados oralmente, e sim verificaram efeitos de hepatoproteção (GBADEGESIN *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2009; LEE *et al.*, 2004), supõe-se que as proteínas produzidas pelo fígado, pelos grupos que

receberam *Aloe vera* e mel, provavelmente foram diferentes daquela produzidas na ausência de tratamento (proteínas de fase aguda).

Ao contrário da musculatura esquelética, a musculatura cardíaca não é afetada por alguns dos fatores mediadores de caquexia liberados pelo tumor (tais como o PIF) (LORITE *et al.*, 2001; TISDALE 2009b), portanto não houve queda no teor protéico nos grupos com tumor.

Embora o peso relativo do músculo gastrocnêmio tenha sido bastante diferente entre os grupos, com diminuição especialmente no grupo CW2 (Figura 24), a manutenção da concentração total de proteína muscular (Figura 38C) em todos os grupos com tumor, pode ser justificada com base na hipótese de que, no grupo CW2, ocorreu hipotrofia celular devido à queda do número de fibras musculares, possivelmente devido à apoptose, como já observado em biópsias de tecido muscular, tanto em modelos de câncer-caquexia quanto em pacientes (ISHIKO *et al.*, 2001; BUSQUETS *et al.*, 2007; TISDALE 2009b). A apoptose das fibras musculares é provocada tanto por fatores liberados pelo tumor (PIF, TNF- α) quanto por fatores liberados por órgãos e tecidos do próprio hospedeiro (ex. catecolaminas e corticosteróides) (TISDALE 1999, 2009a, 2009b; ARGILES *et al.*, 2006; JOCKEN *et al.*, 2008). Desta maneira, não haveria queda na concentração de proteína no homogeneizado tecidual, porém, quando considerado o tecido muscular total, houve intensa degradação e mobilização da reserva protéica. Assim, contrariamente ao observado nos animais CW2, a manutenção da concentração protéica similar ao dos controles, bem como menor queda no peso relativo do músculo gastrocnêmio (Figura 24), nos grupos tratados com *Aloe vera* e mel (CWA2, AW2 e AWA2), sugerem possível ação do tratamento na preservação de reservas protéicas e controle da espoliação, provavelmente minimizando o processo de caquexia.

O MDA, indicador de estresse oxidativo, é um metabólito resultante da peroxidação lipídica, preferencialmente da membrana celular, o que resulta em instabilidade desta membrana e alterações nas suas características, fundamentais para a manutenção do estado de equilíbrio da célula (GOMES-

MARCONDES & TISDALE, 2002). Além disso, o MDA é capaz de conjugar-se aos ácidos nucleicos gerando outros subprodutos, provocando assim dano ao DNA (MARNETT 1999, 2002).

No tecido hepático, pôde-se verificar que todos os grupos experimentais apresentaram menor concentração de MDA em relação àquela observada no controle CC2 (Figura 39A). A resposta tecidual a situação de estresse, normalmente, está vinculada ao equilíbrio entre a produção de produto do estresse oxidativo com a atividade das enzimas antioxidantes. Assim, mesmo em tecidos fisiologicamente estáveis encontra-se estresse oxidativo, que pode ser considerado normal, pois há formação de radicais livres decorrente do processo de respiração celular, que por sua vez podem induzir a formação de produtos indicadores de estresse oxidativo. Desse modo, em relação aos demais grupos experimentais, principalmente aqueles portadores de tumor, ressalta-se a possibilidade do desbalanço entre produtos do estresse oxidativo e enzimas anti-oxidantes. Assim, mesmo a menor concentração de MDA no tecido hepático, nos grupos com tumor, estaria diretamente correlacionada ao aumento do estresse oxidativo se houver menor atuação (atividade) das enzimas anti-oxidantes.

No músculo cardíaco, a concentração de MDA (Figura 39B) elevou-se em CW2, AC2, AW2 e AWA2, e no grupo CWA2 manteve-se similar ao controle CC2. Embora os dados não tenham apresentado diferenças estatisticamente significativas, sugere-se menor tendência ao estresse oxidativo em CWA2 e conseqüente preservação do miocárdio neste grupo, justificando novamente os efeitos benéficos do tratamento com *Aloe vera* e mel. No tecido muscular, não se observou diferença significativa na concentração de MDA entre os grupos (Figura 39C), apenas tendência à elevação no grupo AC2, que novamente estaria sendo compensada pela ação de enzimas antioxidantes.

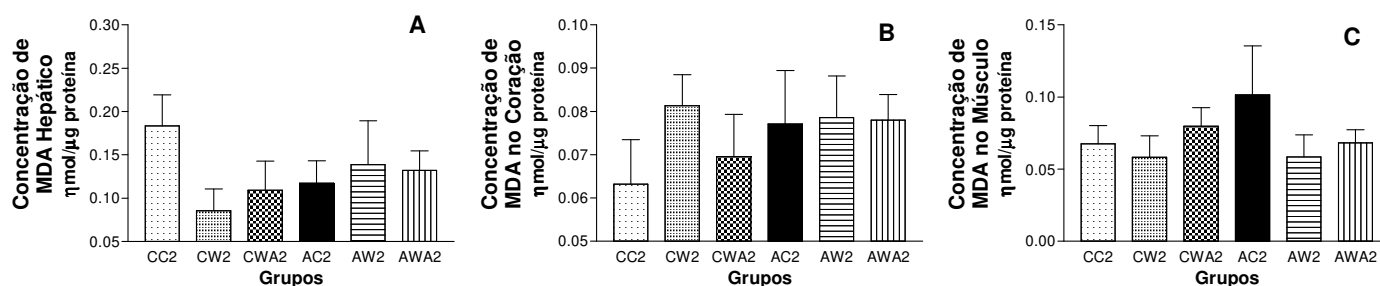


Figura 39. Concentração de MDA no fígado (A), no miocárdio (B) e no músculo gastrocnêmio (C) dos grupos experimentais controle e tratados com *Aloe vera* e mel, com e sem inoculação do tumor. Legenda vide Figura 19. Sem diferença estatisticamente significativa, segundo método Análise de Variância (ANOVA).

Sustentando a hipótese de que o estresse oxidativo possa ser minimizado pela atuação de enzimas antioxidantes ou fatores que previnam a produção de radicais livres, existem relatos de que *Aloe vera* possui propriedades antioxidantes e contra a pró-oxidação de membrana e dano celular (HU *et al.*, 2003; LEE *et al.*, 2000; SINGH *et al.*, 2000). Também já foi verificado que o mel possui componentes antioxidantes, entre eles, flavonóides (GHELDOLF *et al.*, 2002; FAHEY & STEPHENSON, 2002).

Muitas das substâncias químicas, incorporadas ou geradas pelas células, sofrem biotransformação, conjugação e eliminação. As enzimas da Fase I (família do citocromo P450) catalisam reações que aumentam a polaridade da substância original através da introdução ou exposição de corpos polares. Através dessas reações, drogas e outros metabólitos podem sofrer ativação ou inativação. As enzimas de Fase II geralmente têm função de destoxificação, promovem conjugação dos grupos polares funcionais dos metabólitos gerados na Fase I com outras substâncias, visando diminuição da toxicidade e facilidade de eliminação. Durante a Fase III ocorrem os processos de eliminação e transporte dos metabólitos gerados (ANDRADE *et al.*, 2009).

Visando a melhor compreensão do significado das alterações observadas quanto ao teor de MDA, encontrado nos diferentes grupos e tecidos analisados (Figura 39), analisou-se as atividades de enzimas antioxidantes, relacionadas tanto ao processo de remoção das espécies reativas de oxigênio (superóxido dismutase e catalase) (MATES *et al.*, 1999; VALKO *et al.*, 2006; BAG & BAG, 2008;

NISHIKAWA *et al.*, 2009), quanto à metabolização do MDA e de outras substâncias tóxicas (glutathione-S-transferase) (MARNETT 1999, 2002, TSUCHIDA & SATO, 1992; VALKO *et al.*, 2006).

As glutathione-S-transferases (GST) pertencem às enzimas de destoxificação de Fase II e são responsáveis pela conjugação da glutathione a diversos componentes eletrofílicos, incluindo carcinógenos, medicamentos e produtos do estresse oxidativo (VALKO, 2006; TSUCHIDA & SATO, 1992; MARNETT, 1999). A atividade da GST e de outras enzimas destoxicadoras de Fase II é essencial para a manutenção da integridade da célula, e em geral sua atividade está alterada em células tumorais e em outras situações patológicas (TSUCHIDA & SATO, 1992).

Uma vez que o fígado possui papel central na destoxificação do organismo é importante verificar-se a expressão de GST nesse tecido. Neste trabalho, pôde-se observar que a atividade da GST hepática no grupo CW2 manteve-se semelhante aos controles CC2 e AC2, tendendo ao decréscimo em CWA2, AW2 e principalmente em AWA2 (Figura 40A). No coração, a atividade da GST apresentou tendência de aumento nos grupos CW2 e CWA2 e nos grupos AW2 e AWA2 manteve-se similar às dos controles CC2 e AC2 (Figura 40B). Já no músculo gastrocnêmio, observou-se clara tendência ao aumento na atividade da GST em AC2 em relação ao controle CC2, enquanto que nos demais grupos (CW2, CWA2, AW2 e AWA2) a atividade da GST foi similar a do controle CC2 (Figura 40C).

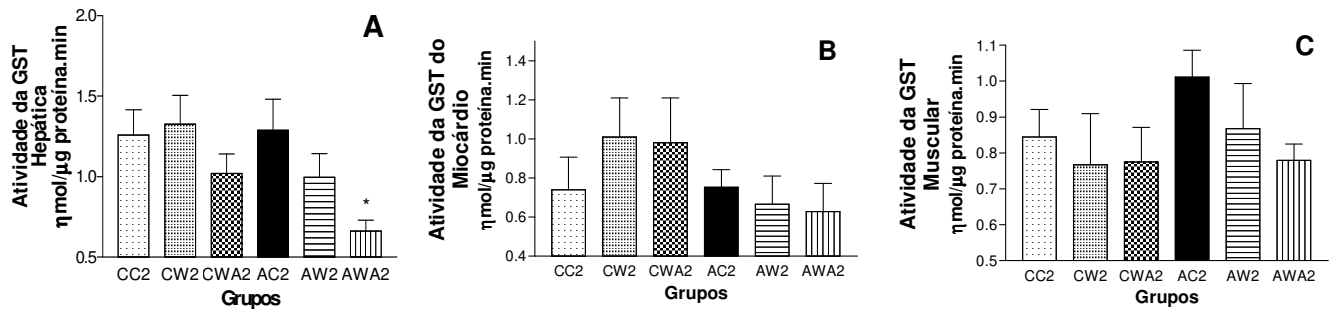


Figura 40. Atividade enzimática da GST hepática (A), do coração (B) e do músculo gastrocnêmico (C) dos grupos experimentais controle e tratados com *Aloe vera* e mel, com e sem inoculação do tumor. Legenda vide Figura 19. * $P < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa entre CW e AWA.

A queda na atividade da GST, provavelmente, seria compensada por atividade elevada de outras enzimas antioxidantes e complexos enzimáticos responsáveis pela destoxificação (enzimas de Fase II), caso contrário sugere-se maior susceptibilidade ao estresse oxidativo. Assim, sugere-se que a manutenção da atividade normal de GST hepática no grupo controle CC2 contrabalanceou o MDA observado neste grupo (Figura 39A). Por outro lado, de maneira similar o decréscimo na atividade enzimática não pode ser interpretado isoladamente como fator negativo, pois o aumento na atividade da GST, observado nos grupos com tumor em relação aos controles, provavelmente refletiria na tentativa de respostas celulares que contrabalanceassem o aumento do estresse oxidativo gerado por fatores liberados pelo tumor.

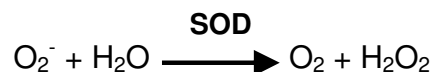
No caso do miocárdio dos grupos CW2 e CWA2, observou-se duas situações distintas quanto as respostas antiestresse. No grupo CW2, houve tendência ao aumento no teor de MDA (Figura 39B) associada a tendência a elevação na atividade de GST (Figura 40B), possivelmente contrabalanceando a elevada produção de MDA, decorrente da peroxidação lipídica. Já no grupo CWA2, houve tendência a aumento na atividade de GST (Figura 40B) associada a manutenção do teor de MDA próximos aos dos controles (Figura 39B), sugerindo que nesse grupo provavelmente houve menor estresse oxidativo e/ou maior metabolização do MDA através da atividade da GST.

Mais uma vez esses dados, combinados, sugerem que a administração de *Aloe vera* e mel, após a indução tumoral, exerceu efeitos benéficos, preservando assim o tecido cardíaco.

O aumento da atividade da GST nos músculos do grupo AC2 possivelmente contrabalanceou a tendência a aumento do MDA observado no tecido muscular deste grupo (Figura 39C). Já foi relatado aumento na atividade da GST, em ratos saudáveis, devido à administração de *Aloe vera* em órgãos como pulmão, rim e estômago (SINGH *et al.*, 2000). Assim, os dados obtidos no presente trabalho confirmam que também pode ocorrer aumento da atividade da GST em tecido muscular.

Estudos demonstraram que, em ratos saudáveis, tanto *Aloe vera*, quanto o mel foram claramente indutores do sistema enzimático de Fase II (SINGH *et al.*, 2000; FAHEY & STEPHENSON, 2002). Portanto, a tendência a queda observada na atividade da GST nos grupos tratados com *Aloe vera* e mel (CWA2, AW2 e AWA2 (Figura 40) provavelmente não estaria relacionada ao estresse oxidativo e dano celulares, pois as concentrações de MDA, no tecido hepático destes grupos, também apresentou-se mais reduzida que o grupo controle CC2 (Figura 39).

A defesa do organismo contra a produção de radicais livres está relacionada a atividade de enzimas antioxidantes, relacionadas a remoção das espécies reativas de oxigênio (superóxido dismutase e catalase) (MATES *et al.*, 1999; VALKO *et al.*, 2006, BAG & BAG, 2008; NISHIKAWA *et al.*, 2009). A primeira defesa contra o radical ânion superóxido (O_2^-) é feita pela enzima superóxido dismutase (SOD), que catalisa a dismutação desse ânion (O_2^-) em oxigênio (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) segundo a reação (SATO *et al.*, 1992):



No tecido hepático, observou-se que a atividade da SOD decresceu em todos os grupos experimentais quando comparados ao controle CC2, sendo esta queda estatisticamente significativa em CW2, AW2 e AWA2 (Figura 41A). Analisando-se agora o coração, houve tendência à elevação da atividade da superóxido dismutase em CW2 e tendência à diminuição em AWA2, em relação ao

controle CC2; nos demais grupos (CWA2, AC2 e AW2), a atividade da SOD do miocárdio apresentou valor similar ao do controle CC2 (Figura 41B). Já a atividade da superóxido dismutase do músculo gastrocnêmio revelou-se aumentada em AC2 e diminuída em AWA2 em relação ao controle CC2; os demais grupos (CW2, CWA2 e AW2) mantiveram valores similares aos do controle CC2 (Figura 41C).

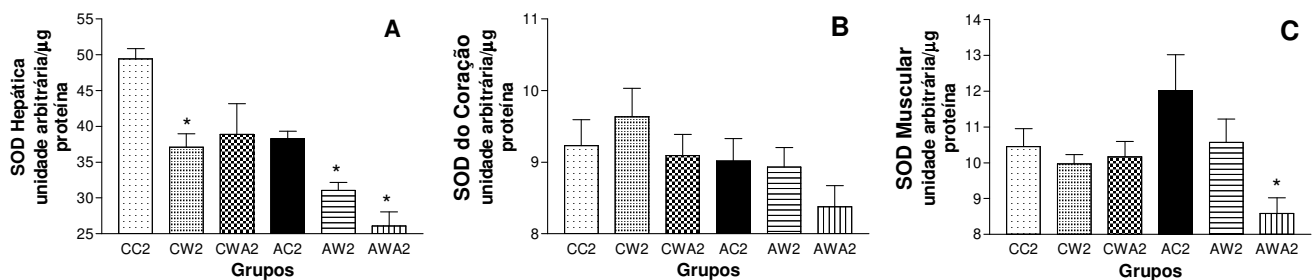


Figura 41. Atividade da superóxido dismutase hepática (A), no miocárdio (B) e no músculo gastrocnêmio (C) dos grupos experimentais controle e tratados com *Aloe vera* e mel, com e sem inoculação do tumor. Legenda vide Figura 19. * $P < 0,05$ indica diferença significativa em relação ao controle CC2.

Complementarmente a atividade da GST (Figura 40), a atividade da SOD no fígado dos animais CC2 (Figura 41A) auxiliou no controle do estresse oxidativo normal, observado em células saudáveis (Figura 39A). Os resultados relativos à atividade da SOD no tecido hepático sugerem que houve aumento da susceptibilidade ao estresse oxidativo no fígado de animais com tumor, independente do tratamento ou não com *Aloe vera* e mel, embora, no grupo CWA2, a queda da atividade da SOD não tenha sido significativa (Figura 41A). Porém, como foi observado nas análises imunohistoquímicas do tecido hepático para Ki-67, Bax e Bcl-2 e o balanço dessas proteínas relacionadas à proliferação, morte e sobrevivência celular, respectivamente (Figuras 13, 15, 17 e 18), a administração de *Aloe vera* e mel aparentemente auxiliou na prevenção de dano hepático provocado pelo tumor, principalmente no início do desenvolvimento tumoral. Ao final de 20 dias, esse comportamento de proteção do tratamento *Aloe vera* e mel foi reduzido aquele verificado no início do crescimento tumoral. Provavelmente, o tratamento aumentou a proliferação celular, melhorando a capacidade de metabolização hepática de fatores liberados pelo tumor, com isso retardando a

susceptibilidade a apoptose, via modulação na expressão das proteínas Bax e Bcl-2 (KIM *et al.*, 2009, GBADEGESIN *et al.*, 2009).

Embora tenha sido observada tendência à elevação na atividade da SOD no miocárdio de animais do grupo CW2 (Figura 41B), houve evidências de estresse oxidativo nesse tecido, já que o teor de MDA no miocárdio desse grupo também tendeu a elevação (Figura 39B). Desse modo, pôde-se supor que o aumento na atividade da SOD observado não foi suficiente para conter a atuação dos íons superóxido nas fibras musculares cardíacas, cuja produção teria aumentado em decorrência do desenvolvimento neoplásico (MANTOVANI *et al.*, 2004).

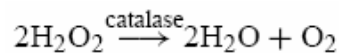
Por outro lado, a tendência à manutenção ou queda na atividade da SOD no miocárdio dos grupos AW2 e AWA2, respectivamente (Figura 41B), coincide com o aumento no teor de MDA no coração desses mesmos grupos (Figura 39B), o que sugere aumento no estresse oxidativo, pois no grupo AW2 provavelmente houve aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (no caso O_2^-) devido ao desenvolvimento tumoral (MANTOVANI *et al.*, 2004) e no grupo AWA2, possivelmente, a queda na atividade da SOD permitiu o aumento do estresse oxidativo (FANG *et al.*, 2007, 2009).

No miocárdio dos animais CWA2, houve manutenção da atividade da SOD (Figura 41B), bem como do teor de MDA (Figura 39B), que foram próximos aos valores observados para o controle CC2, sugerindo que nesse grupo, o estresse oxidativo foi menor que nos demais grupos com tumor, indicando possível ação benéfica da administração de *Aloe vera* e mel de maneira terapêutica. Como mencionado anteriormente, existem relatos de que tanto a *Aloe vera* (SINGH *et al.*, 2000), quanto o mel (JAGANATHAN & MANDAL, 2009a) podem ter efeitos antioxidantes.

Como apontado anteriormente, o estresse oxidativo tecidual, e principalmente no tecido muscular esquelético, refere-se sempre ao desbalanço dos processos oxidativos e de defesa (atuação das enzimas anti-oxidantes); nesse caso, os animais saudáveis que receberam *Aloe vera* e mel apresentaram aumento da atividade anti-oxidante (elevação da GST e SOD, Figuras 40C e 41C)

contrabalanceando o aumento da concentração de MDA (Figura 39C). Os demais grupos, que mantiveram ou não, a atividade da SOD não manifestaram aumento de estresse oxidativo no músculo gastrocnêmio, levando-se em consideração o índice do teor de MDA (Figura 39C).

Como já mencionado, outra enzima que participa do processo de eliminação de espécies reativas de oxigênio é a catalase. Esta é considerada o maior componente da defesa antioxidante primária, catalisando a decomposição de H_2O_2 em água (como apresentada na reação abaixo) (VALKO *et al.*, 2004), especialmente quando os níveis de peróxido de hidrogênio estão muito elevados, como nas situações de estresse (ANDRADE JR., DAHIR RAMOS *et al.*, 2005):



A catalase exibe normalmente atividade elevada no tecido hepático (NISHIKAWA *et al.*, 2009) e já foi relatado que o desenvolvimento tumoral é capaz de provocar queda na atividade da catalase no fígado em ratos (YASMINEH *et al.*, 1991). No presente trabalho, a atividade da catalase hepática apresentou tendência à queda nos grupos CW2 e AWA2 em relação ao controle CC2, enquanto os grupos CWA2, AC2 e AW2 tenderam à elevação (Figura 42A), embora não estatisticamente significativo. No coração, a atividade da catalase no grupo CWA2 tendeu a permanecer similar a do controle CC2, enquanto houve queda ou tendência à queda em todos os outros grupos (Figura 42B). A atividade da catalase no músculo gastrocnêmio tendeu a se elevar em CW2, decair em AW2 e AWA2, e no grupo CWA2 manteve-se similar aos controles CC2 e AC2 (Figura 42C).

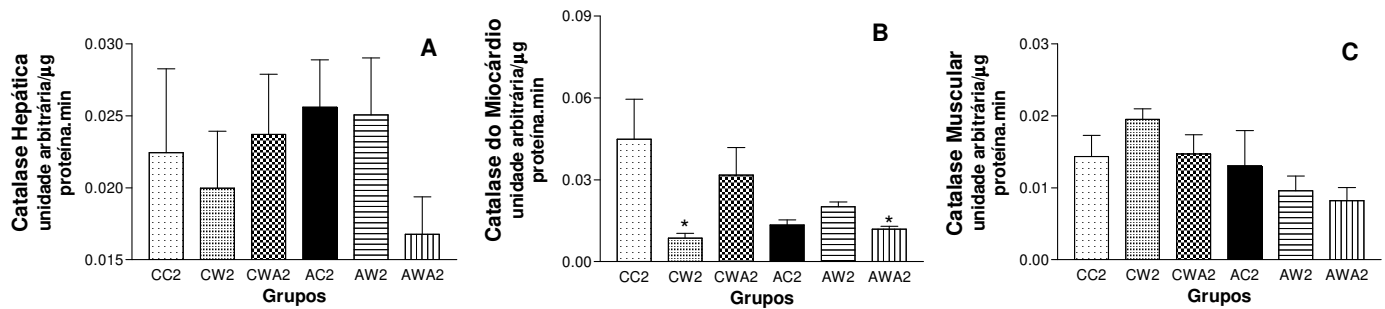


Figura 42. Atividade da catalase hepática (A), do miocárdio (B) e do músculo gastrocnêmio (C) dos grupos experimentais controle e tratados com *Aloe vera* e mel, com e sem inoculação do tumor. Legenda vide Figura 19. * $P < 0,05$ indica diferença significativa em relação ao controle CC2.

As quedas concomitantes na atividade da SOD (Figura 41A) e da catalase (Figura 42A) no tecido hepático dos grupos CW2 e AWA2 podem indicar maior susceptibilidade ao estresse oxidativo, mesmo que não tenha sido observado aumento concomitante do teor de MDA (Figura 39A). No caso do grupo CW2, o paradoxo entre diminuição da atividade de enzimas antioxidantes e reduzida concentração de MDA, em parte, seria explicado pela tendência ao aumento na atividade da GST (Figura 40) e talvez de outras enzimas de Fase II, responsáveis pela metabolização do MDA (MARNETT 1999, 2002, TSUCHIDA & SATO, 1992; VALKO *et al.*, 2006). No grupo AW2, a tendência ao aumento na atividade da catalase (Figura 42A) poderia atenuar os efeitos provocados pela queda na atividade da SOD no tecido hepático (Figura 41A), pois a concentração de MDA hepática nesse grupo foi reduzida (Figura 39A), assim como a de GST (Figura 40A). Novamente, dentre os grupos com tumor, o CWA2 apresentou melhores condições, uma vez que as atividades da SOD, bem como da catalase tenderam a permanecer próximas às atividades do controle CC2 no tecido hepático (Figuras 41A e 42A), provavelmente diminuindo a susceptibilidade ao estresse oxidativo.

Os dados relativos à atividade da SOD e da catalase (Figuras 41B e 42B), bem como o teor de MDA e atividade da GST (Figuras 39B e 40B) no miocárdio, dos diferentes grupos experimentais, indicaram que nos grupos CW2, AW2 e AWA2 ocorreu estresse oxidativo sem haver contrabalanço através de aumento da atividade antioxidante (como é o caso dos controles CC2 e AC2). Já no grupo

CWA2, a preservação da atividade das enzimas antioxidantes SOD e catalase (Figuras 41B e 42B) possibilitou queda no estresse oxidativo, uma vez que o teor de MDA permaneceu semelhante ao dos controles (Figura 39), mesmo com a menor atividade da GST (Figura 40B), sugerindo assim que a peroxidação lipídica neste grupo estaria controlada, corroborando com estudos que mostraram ação antioxidante da *Aloe vera* em diversos tecidos de animais saudáveis (SINGH *et al.*, 2000). Essas suposições ressaltam os possíveis efeitos benéficos do tratamento com *Aloe vera* e mel, após a indução de tumor, já que a manutenção da capacidade anti-oxidante é interessante ao organismo protegendo-o dos efeitos produzidos pelo crescimento das células neoplásicas (NISHIKAWA *et al.*, 2009).

O acesso ao nível de atividade celular global (síntese, degradação, proliferação, etc) pode ser verificado pela atividade enzimática da fosfatase alcalina, como já reportado para tipos celulares de diversos órgãos e tecidos (MARTINS *et al.*, 2001), sendo esta atividade comumente alterada em situações patológicas, incluindo distrofia muscular, intoxicação por metais pesados e câncer (KIRKEBY & MOE, 1985; BAG *et al.*, 1999; BROWN & SINGH, 2006; GOODLAD & CLARK, 1982; TOLEDO *et al.*, 2004; VENTRUCCI *et al.*, 2004).

Não foi observada diferença significativa entre os grupos quanto à atividade da fosfatase alcalina, no entanto, houve tendência à menor atividade nos grupos que receberam tratamento com o homogeneizado de *Aloe vera* e mel por períodos prolongados (AC2, AW2 e AWA2), além disso, houve tendência à elevação em CW quando comparados ao controle CC2 (Figura 43A). No coração, pôde-se observar que a atividade da enzima fosfatase alcalina caiu em todos os grupos experimentais em relação ao controle CC2 (Figura 43B). No músculo gastrocnêmio, a atividade da fosfatase alcalina revelou-se semelhante entre os controles CC2 e AC2, porem apresentou queda em todos os grupos com tumor, menos pronunciada em AW2 e AWA2 (Figura 43C), possivelmente indicando tentativa de manutenção da atividade celular próxima ao normal nestes grupos.

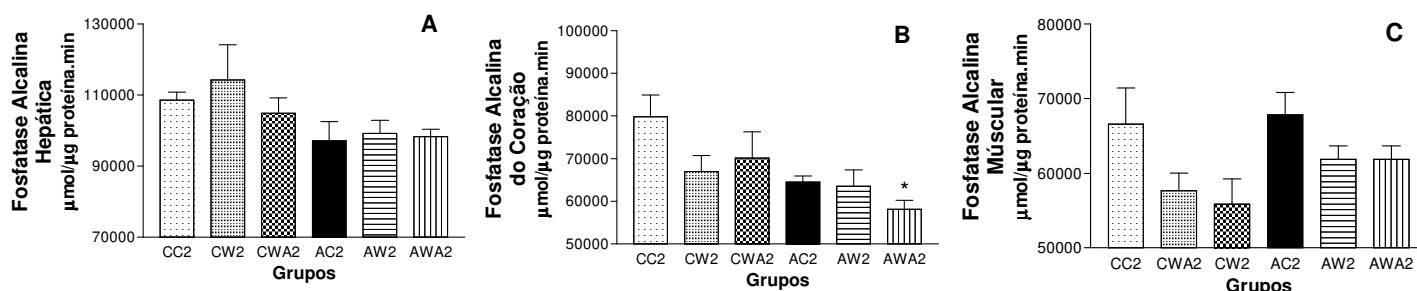


Figura 43. Atividade da fosfatase alcalina hepática (A), do miocárdio (B) e do músculo gastrocnêmio (C) dos grupos experimentais controle e tratados com *Aloe vera* e mel, com e sem inoculação do tumor. Legenda vide Figura 19.

A tendência à elevação na atividade da fosfatase alcalina hepática, observada em CW2, corrobora com a hipótese de edema, já que tumefação dos hepatócitos também pode ocasionar aumento da fosfatase alcalina (GOULART & MATTOS FILHO, 2003). Além disso, já foi observado aumento da atividade da fosfatase alcalina no fígado de ratos com tumor de Walker 256 (GOODLAD & CLARK, 1982), porém o tratamento com *Aloe vera* e mel, parece atenuar essa tendência.

O presente trabalho avaliou os efeitos da administração de *Aloe vera* e mel, como forma de prevenir o estabelecimento do implante tumoral ou terapêutica, tanto para os tecidos do hospedeiro, como discutido anteriormente, como no tecido neoplásico. Assim, a avaliação dos processos anti-oxidativos (atividade de enzimas anti-oxidantes) como do produto de estresse oxidativo (MDA) mostraram que o tratamento com *Aloe vera* e mel proporcionou alteração na resposta celular neoplásica.

A concentração protéica do tumor no grupo CWA2 tendeu a ser mais baixa que nos demais grupos (Figura 44A), ressaltando os possíveis benefícios do tratamento com *Aloe vera* e mel, reduzindo assim o crescimento tumoral. A concentração de MDA no tumor sugere que o homogeneizado de *Aloe vera* e mel, especialmente quando administrado somente após a indução de tumor (CWA2), afetou de maneira diferente o tecido tumoral em comparação aos efeitos sobre os tecidos do hospedeiro, pois a elevação da concentração de MDA nesse grupo demonstrou provável aumento do estresse oxidativo no tecido tumoral (Figura 44B). Por outro lado, embora a atividade da

GST no tecido tumoral tenha sido similar em todos os grupos experimentais, é possível observar, que de certo modo, a atividade enzimática da GST foi inversamente proporcional ao tempo de administração do homogeneizado de *Aloe vera* e mel, sendo então $CW2 > CWA2 > AW2 > AWA2$ (Figura 44C). A atividade da enzima superóxido dismutase mostrou tendência à elevação no grupo CWA2 em relação aos demais grupos experimentais (CW2, AW2 e AWA2) (Figura 44D). Da mesma forma ocorrida para a enzima GST: a atividade enzimática da catalase, no tecido tumoral, também foi, aparentemente, inversamente proporcional ao tempo de administração do homogeneizado de *Aloe vera* e mel, tendo então seu maior valor em CW2, grupo não tratado, e o menor valor no grupo AWA2, que recebeu tratamento antes e após a indução de tumor (Figura 44E). No tecido tumoral, a atividade da fosfatase alcalina foi semelhante entre os grupos CW2, AW2 a AWA2, enquanto que no grupo CWA2, essa enzima apresentou queda de atividade (Figura 44F).

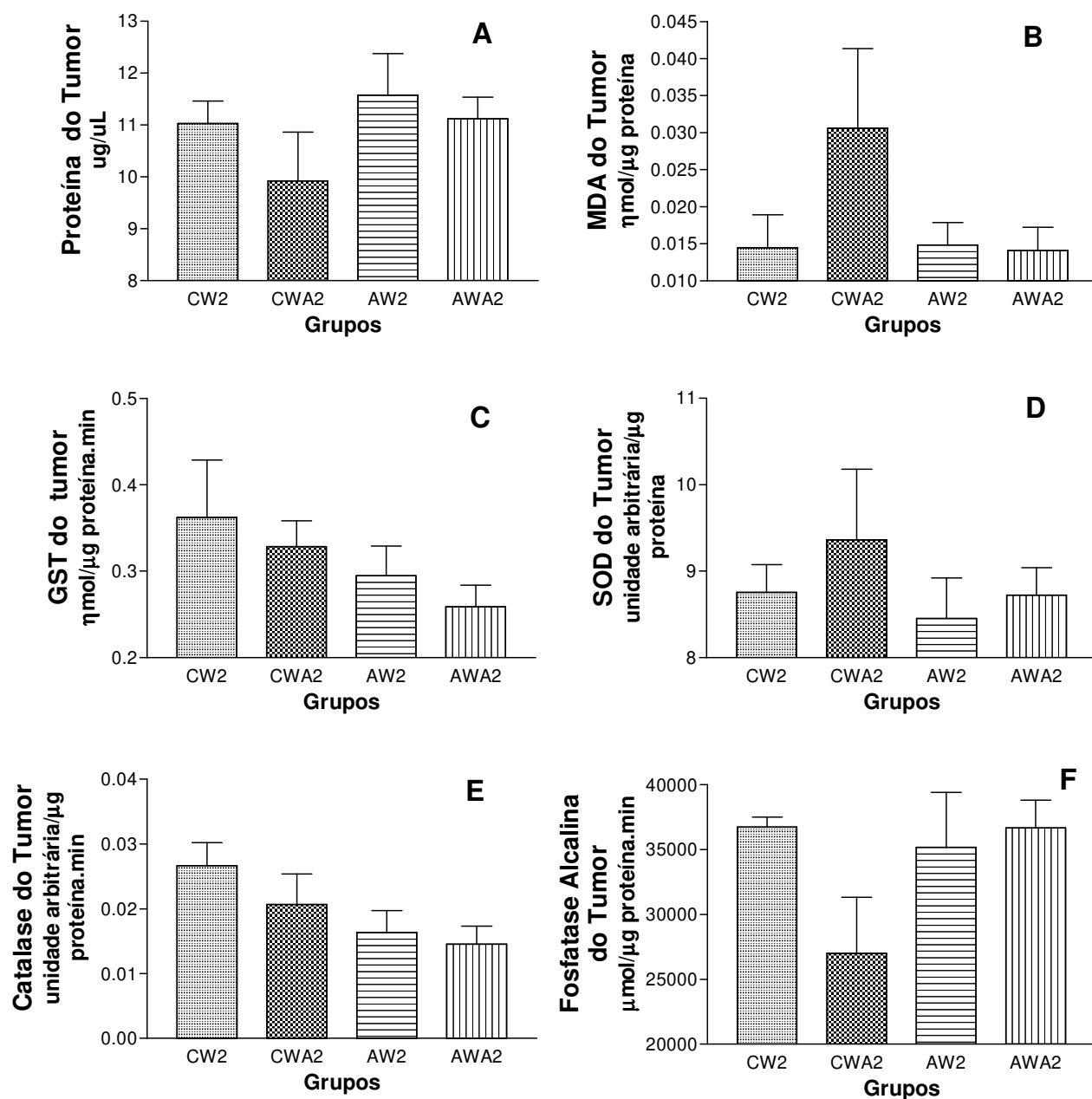


Figura 44. Concentração de proteína tumoral total (A), de MDA (B), da GST (C), da superóxido dismutase (D), da catalase (E) e da fosfatase alcalina (F) do tecido tumoral dos grupos experimentais controle e tratados com *Aloe vera* e mel.. Legenda vide Figura 34.

O teor de MDA e de seus derivados pode apresentar-se elevado em tecidos saudáveis de pacientes com tumor, bem como em animais-modelo (WANG, 1996; GOMES-MARCONDES & TISDALE, 2002), como resultado do estresse oxidativo gerado por fatores liberados pelo tumor.

Também já foi relatado que o teor de MDA e de seus derivados podem estar diminuídos no tecido tumoral (WANG, 1996).

Neste trabalho, não foram observadas variações estatisticamente significativas no teor de MDA apresentado pelos diferentes grupos experimentais em tecidos saudáveis (fígado, coração e músculo gastrocnêmio). Entretanto, no tecido tumoral houve tendência a aumento do teor de MDA no grupo CWA2 de forma bastante pronunciada (Figura 44B).

O MDA é produto de peroxidação lipídica e, portanto, resultado do estresse oxidativo gerado por espécies reativas de oxigênio (ROS), entre elas o íon superóxido (O_2^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (GOMES-MARCONDES & TISDALE, 2002; MARNETT 1999, 2002, WAGNER *et al.*, 1994). Em quantidades super-elevadas, as ROS poderiam ser letais para a célula, uma vez que provocam dano a estruturas celulares essenciais a integridade e sobrevivência celular (FANG *et al.*, 2007), além de terem a capacidade de desencadear apoptose por provocar permeabilização na membrana mitocondrial, levando à liberação de fatores pró-apoptóticos (BRENNER & GRIMM, 2006). Muitos quimioterápicos, entre eles vinblastina, cisplatina, mitomicina C, doxorubicina, camptotecina, inostamicina e neocarzinostatina têm ação antitumoral devido à ativação de apoptose dependente de espécies reativas de oxigênio (SIMIZU *et al.*, 1998; FANG *et al.*, 2007).

Novas estratégias anticâncer, que vem sendo pesquisadas, consistem justamente em aumentar o estresse oxidativo nas células tumorais, elevando as ROS até níveis letais para estas células, na chamada “Terapia de Oxidação” (FANG *et al.*, 2007; 2009). A obtenção desse resultado ocorre através de dois mecanismos principais: (a) aumento da produção de ROS através da administração de enzimas oxidantes para as células-alvo (SAWA *et al.*, 2000; FANG *et al.*, 2002; BEN-YOSEPH & ROSS, 1994; YOSHIKAWA *et al.*, 1995; STEGMAN *et al.*, 1998), ou (b) inibição das enzimas antioxidantes que atuam no tecido tumoral, entre elas SOD, catalase e GST (BRENNAN & GRIMM, 2006; HUANG *et al.*, 2000; FANG *et al.*, 2003) (Figura 45).

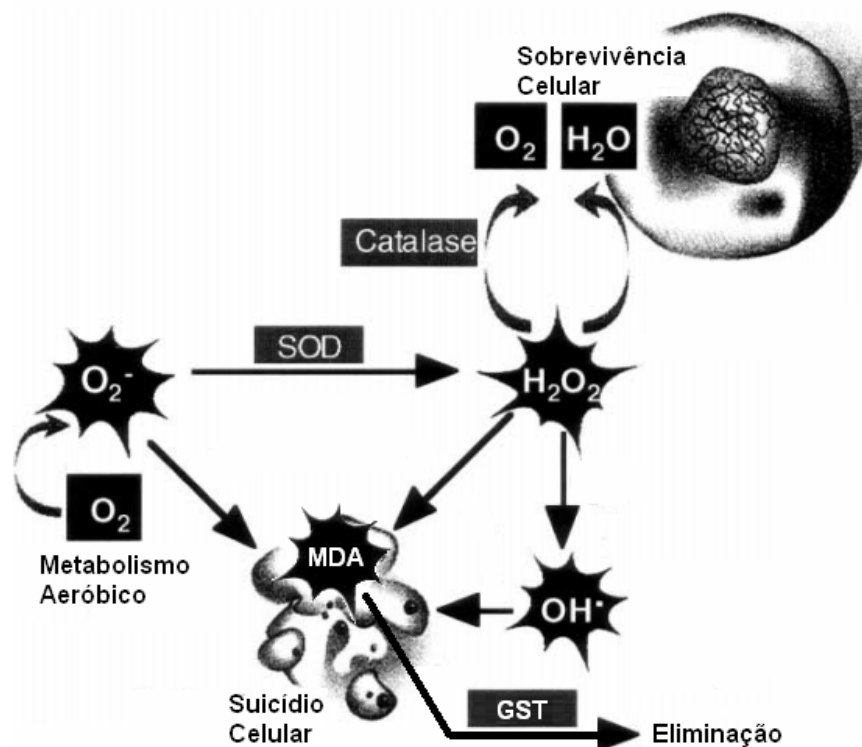


Figura 45. Estresse Oxidativo e Enzimas Antioxidantes: alvos para a “Terapia de Oxidação”. Adaptado de Fang *et al.*, 2007.

Uma vez que *Aloe vera* e mel, quando administrados após a indução do câncer (CWA2), aparentemente aumentaram o estresse oxidativo no tecido tumoral, visto a tendência à maior produção de MDA (Figura 44B), e paralelamente os resultados obtidos no primeiro experimento do presente trabalho, mostraram maior tendência à apoptose ao longo do desenvolvimento do carcinossarcoma de Walker 256 em células tumorais de ratos tratados com *Aloe vera* e mel (Figura 11), supõe-se que o tratamento com *Aloe vera* e mel estaria auxiliando no combate ao tumor, gerando estresse oxidativo e apoptose no tecido tumoral.

Existem vários relatos na literatura de alterações na atividade da GST no tecido tumoral em diversos tipos de câncer (TSUCHIDA & SATO, 1992). Além disso, relata-se que a maior atividade da GST em diversas linhagens de células cancerosas relaciona-se à resistência a quimioterápicos, enquanto linhagens celulares com menor atividade dessa enzima apresentavam-se ainda sensíveis às drogas (WANG *et al.*, 1989; BATIST *et al.*, 1986; COLE *et al.*, 1990; TEICHER *et al.*, 1987). Este

fato também já foi observado em células do tumor de Walker 256 (WANG & TEW, 1985; BULLER *et al.*, 1987; CLAPPER & TEW, 1989). Esta correlação entre aumento de atividade da GST e quimioresistência fica evidente sabendo-se que a GST participa da metabolização de medicamentos (VALKO, 2006).

Portanto, a tendência a queda na atividade tumoral da GST proporcional ao tempo de administração de *Aloe vera* e mel observada neste trabalho, sugere o possível efeito do tratamento em diminuir a capacidade anti-oxidativa do tumor e com isso aumentar a morte celular programada dessas células neoplásicas em função do estresse oxidativo (NIIZUMA *et al.*, 2009), como foi observado pelo aumento do índice de proteína pro-apoptóticas (Bax) e diminuição de proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2) no tecido tumoral, apresentado nas Figuras 8 e 10. Assim, sabendo-se que a menor atividade de GST manteria a susceptibilidade das células tumorais à ação dos quimioterápicos, sugere-se a necessidade de maiores investigações sobre a melhora na eficiência quimioterápica, através da associação de terapias coadjuvantes (*Aloe vera* e mel) junto à terapia convencional. Fato observado anteriormente por Gribel' & Pashinskii (1986, 1990) e Wattenberg (1986), onde a administração de *Aloe vera* e mel, a ratos com tumor, potencializou a ação antitumoral dos quimioterápicos 5-fluoracil e ciclofosfamida.

Embora atividade da SOD em CWA2 tenha apresentado tendência à elevação, alterações em outras vias do processamento de espécies reativas de oxigênio e metabólitos nocivos possivelmente conduziram ao aumento do estresse oxidativo no tecido tumoral, já que nesse mesmo grupo (CWA2), a atividade da GST tendeu à diminuição (Figura 44C) e a concentração de MDA tendeu à elevação (Figura 44). Além disso, sabe-se que, uma vez que a atuação da SOD leva à formação de H_2O_2 , posteriormente dissociada em radicais OH^\cdot , que também provocam estresse oxidativo e dano às células, aumento na atividade de SOD sem aumento concomitante na atividade de enzimas responsáveis pela conversão de H_2O_2 em compostos menos reativos (entre elas a catalase) é danoso às

células (MUZYKANTOV *et al.*, 1996; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; FANG *et al.*, 2009). Esses dados sugerem que o tratamento com homogeneizado de *Aloe vera* e mel após a indução de tumor provavelmente foi capaz de aumentar o estresse oxidativo no tecido tumoral. A elevação da concentração de MDA nos tumores do grupo CWA2 (Figura 44B) associada à tendência a aumento da atividade da SOD, que como mencionado anteriormente produz H_2O_2 (dissociado posteriormente em OH^\cdot , caso não seja processado por outras enzimas) e menor atividades da GST e catalase (Figuras 44C e E) sugerem maior estresse oxidativo no tecido tumoral desse grupo. Porém mesmo com a baixa concentração de MDA, principalmente nos grupos AW2 e AWA2 (Figura 44B), o decréscimo da atividade de enzimas anti-oxidantes (Figura 44C, D e E) também poderia aumentar a susceptibilidade ao estresse oxidativo no tecido tumoral desses grupos. Contrariamente, o grupo CW2 apresentou baixos níveis de MDA com atividade mais elevada das enzimas anti-oxidantes, sugerindo manutenção dos processos celulares e menor estresse oxidativo e dano, refletindo em provável integridade dessas células neoplásicas.

Como já mencionado, uma das vertentes estudadas na “Terapia de Oxidação” (FANG *et al.*, 2007; 2009) consiste justamente em inibir a atividade das enzimas antioxidantes que atuam no tecido tumoral, entre elas SOD, catalase e GST (HUANG *et al.*, 2000; FANG *et al.*, 2003).

Estudos indicam que índices elevados de fosfatase alcalina no tumor ou no plasma sanguíneo estão correlacionados com tendência à metástase e prognóstico ruim (LEVINE & ROSENBERG, 1979; BROWN & SINGH, 2006), portanto a queda de atividade apresentada em CWA2, provavelmente, indica que o homogeneizado de *Aloe vera* e mel tende a diminuir a agressividade do tumor. Além disso, a menor atividade celular tumoral seria indicativo de morte celular programada, corroborando com os efeitos da *Aloe vera* e mel sobre as atividades das enzimas anti-oxidantes e aumento da peroxidação de lipídios, conduzindo ao aumento do estresse oxidativo.

Conjuntamente, os dados obtidos no presente trabalho quanto ao estresse oxidativo, espoliação e atividade celular em órgãos do hospedeiro e tecido tumoral de animais implantados com carcinossarcoma de Walker 256 submetidos ou não a diferentes tratamentos com *Aloe vera* e mel, confirmam que a presença do tumor de Walker 256 facilita a ocorrência de estresse oxidativo (GOMES-MARCONDES & TISDALE, 2002; MARCONDES *et al* 2008; PERTILE & GOMES-MARCONDES 2008).

Uma vez que o estresse oxidativo decorrente do desenvolvimento tumoral é em parte responsável pelo estabelecimento e manutenção da síndrome câncer-caquexia (BUCK & CHOJKIER, 1996; GOMES-MARCONDES & TISDALE, 2002; MANTOVANI *et al.*, 2004), desbalanços entre a produção/ação das espécies reativas de oxigênio e atividade de enzimas antioxidantes e destoxificadoras, efeitos provocados pelo tumor, podem conduzir a estresse oxidativo, dano celular e caquexia (BUCK & CHOJKIER, 1996; GOMES-MARCONDES & TISDALE, 2002; MANTOVANI *et al.*, 2004; MARNETT 2002; FANG *et al.*, 2009). Neste sentido, os presentes resultados confirmam esta tendência, uma vez que foram encontradas alterações nos padrões de atividade de enzimas como SOD, catalase e GST e no teor de MDA em órgãos como coração, fígado e músculo gastrocnêmio, além de redução de indícios de espoliação de reservas (queda na massa muscular e de gordura) de ratos portadores do carcinossarcoma de Walker 256.

A administração de *Aloe vera* e mel, especialmente apenas após a indução de tumor (CWA2), provavelmente, atenuou o estresse oxidativo e os efeitos catabólicos do tumor sobre tecidos hospedeiros. Existem relatos tanto da presença de substâncias antioxidantes quanto de complexos enzimáticos antioxidantes presentes nas células da *Aloe vera* que associados aos efeitos do mel corroboram com essa suposição (SINGH *et al.*, 2000; CHOI & CHUNG, 2003; JEDDAR *et al.*, 1985; BARDY *et al.*, 2008; COOK & SAMMAN, 1996; CATAPANO, 1997; LOKU *et al.*, 1995; SALAH *et al.*, 1995).

A manutenção das reservas protéica e de gordura do indivíduo com câncer melhorariam a qualidade de vida, a sobrevida e possibilitariam ao paciente suportar melhor o agressivo tratamento convencional do câncer (TISDALE 2000, 2004, 2009a, 2009b).

Situação muito diferente da encontrada nos órgãos do hospedeiro foi evidenciada quando se analisou o tecido tumoral, onde no grupo CW2, a atividade das enzimas antioxidantes foi ser capaz de conter o estresse oxidativo. Em contra partida, a atividade da maioria das enzimas tendeu à redução nos grupos que receberam *Aloe vera* e mel, embora a tendência ao estresse oxidativo tenha sido mais evidente apenas no tecido tumoral do grupo CWA2. Dessa maneira, pôde-se supor que a diminuição no tamanho atingido pelo tumor em CWA2 foi em parte decorrente do possível estresse oxidativo ocorrido nestes tumores.

Diferentes tipos de câncer são muito heterogêneos quanto à atividade de enzimas antioxidantes e estresse oxidativo (TSUCHIDA & SATO, 1992; FRUEHAUF & MEYSKENS, 2007), assim, novas terapias visam induzir a morte de células neoplásicas através de dano celular por indução do estresse oxidativo, aumentando a concentração de espécies reativas de oxigênio ou por diminuição nas atividades das enzimas antioxidantes (SAWA *et al.*, 2000; FANG *et al.*, 2002, 2003, 2009; BEN-YOSEPH & ROSS, 1994; YOSHIKAWA *et al.*, 1995; STEGMAN *et al.*, 1998; BRENNAN & GRIMM, 2006; HUANG *et al.*, 2000). A progressiva queda na atividade da GST nos tumores, de acordo com o tempo de administração de *Aloe vera* e mel, também sugere a necessidade de maiores investigações a cerca da sensibilidade à quimioterápicos das células neoplásicas em associação a terapias coadjuvantes (WANG *et al.*, 1989; BATIST *et al.*, 1986; COLE *et al.*, 1990; TEICHER *et al.*, 1987; WANG & TEW, 1985; BULLER *et al.*, 1987; CLAPPER & TEW, 1989). A ação da *Aloe vera* e do mel sobre a atividade da GST no tecido tumoral poderia auxiliar na reversão da resistência à drogas ou potencializar efeitos dos quimioterápicos (GRIBEL' & PASHINSKII 1986, 1990 e WATTENBERG 1986). Além disso, a administração de *Aloe vera* e mel de maneira anti-

implantação e terapêutica (AWA2) mostrou-se ineficiente ou menos eficiente do que a administração apenas após a indução tumoral – terapêutica (CWA2). Talvez a administração prolongada de *Aloe vera* e mel tenha provocado alterações no sistema imunológico, uma vez que ambos possuem componentes imunomodulatórios (CHOI & CHUNG, 2003; REYNOLDS & DWECK, 1999; JAGANATHAN & MANDAL, 2009a), porém mais estudos precisam ser realizados a fim de elucidar esses mecanismos.

Ressaltando os dados aqui apresentados, a ação antagônica da administração da *Aloe vera* e mel sobre o hospedeiro (preservação) e o tumor (ataque) já foram observadas *in vitro*, onde enquanto linhagens neoplásicas sob tratamento com determinados componentes de *Aloe vera* sofriam apoptose ou menor proliferação, linhagens saudáveis não eram afetadas (PECERE *et al.*, 2000). Assim, o presente trabalho mostrou que o tratamento com *Aloe vera* e mel, de modo terapêutico, manteve em parte os tecidos do hospedeiro em detrimento do crescimento tumoral.

9 – CONCLUSÕES

As respostas geradas pela administração do homogeneizado de *Aloe vera* e mel em ratos portadores de carcinossarcoma de Walker 256 variaram de acordo com a fase de administração do homogeneizado (antes e/ou após a indução de tumor). Os animais tratados apenas após a indução tumoral (grupo CWA2) apresentaram os melhores resultados não apenas quanto à diminuição da massa tumoral, mas também quanto aos efeitos modulatórios sobre os tecidos do hospedeiro e simultâneo efeito deletério sobre o tecido tumoral, enquanto os animais tratados previamente (AW2) e em todo o período (AWA2) apresentaram pouca ou nenhuma resposta positiva, não tendo portanto, neste modelo, papel preventivo contra o estabelecimento do implante tumoral

A ação do homogeneizado de *Aloe vera* e mel diferiu nos tecidos hospedeiros e tumoral. Quanto a análise do estresse oxidativo e a atividade de enzimas antioxidantes destes tecidos, concluiu-se que os tecidos hospedeiros foram “protegidos”, enquanto o tecido tumoral sofreu maior estresse oxidativo, além da ação dos componentes ativos do homogenizado de *Aloe vera* e mel prejudicarem o seu crescimento e aumentarem a propensão à apoptose das células neoplásicas.

10 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

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.*, Dec 20;4(14):1775-84, 2004.

ADAMS J M & CORY S. Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. *Current Opinion in Immunology*, 19:488–496, 2007.

AGUSTSSON T, RYDEN M, HOFFSTEDT J, VAN HARMELEN V, DICKER A, LAURENICKIENE J, ISAKSSON B, PERMERT J, ARNER P. Mechanism of increased lipolysis in cancer cachexia. *Cancer Res* 67:5531–5537, 2007.

AKEV N, TURKAY G, CAN A, GUREL A, YILDIZ F, YARDIBI H, EKIZ EE AND UZUN H. Tumour Preventive Effect of *Aloe vera* Leaf Pulp Lectin (Aloctin I) on Ehrlich ascites Tumours in Mice. *Phytother. Res.* 21, 1070–1075, 2007.

AN J, CHEN Y, HUANG Z. Critical Upstream Signals of Cytochrome c Release Induced by a Novel Bcl-2 Inhibitor*. *The Journal Of Biological Chemistry.*; 279: 19133–19140, 2004.

ANDRADE JR., DAHIR RAMOS *et al.* Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* 31(1) - Jan/Fev de 2005.

ANDRADE RJ, ROBLES M, ULZURRUN E, LUCENA MI. Drug-induced liver injury: insights from genetic studies. *Pharmacogenomics*; Vol. 10, No. 9, Pages 1467-1487, 2009.

ARENDS MJ, MCGREGOR AH, WYLLIE AH: Apoptosis is inversely related to necrosis and determines net growth in tumors bearing constitutively expressed myc, ras, and HPV oncogenes. *Am J Pathol*, 144:1045-1057, 1994.

ARGILES JM, BUSQUETS S, LOPEZ-SORIANO FJ. Cytokines as mediators and targets for cancer cachexia. *Cancer Treat Res*;130:199–217, 2006.

ASHWELL DJ, LU FWM, VACCHIO MS. Glucocorticoids in T cell development and function. *Annu. Rev. Immunol.*; 18:309–345, 2000.

AZEVEDO MTC, ARAÚJO PMF. Influencia de AnticorpoS "Naturais" na Atividade do Sistema Imunonologico. Dissertação de Mestrado. Campinas, 1993.

BAG A BAG N. Target Sequence Polymorphism of Human Manganese Superoxide Dismutase Gene and Its Association with Cancer Risk: A Review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; 17(12):3298-3305, 2008.

BAG S, VORA T, GHATAK R, NILUFER I, D'MELLO D, PEREIRA L, PEREIRA J, CUTINHO C, RAO V. A study of toxic effects of heavy metal contaminants from sludge-supplemented diets on male Wistar rats. *Ecotoxicol Environ Saf.* Feb; 42(2):163-70, 1999.

BARDY J, SLEVIN NJ, MAIS KL, MOLASSIOTIS A. A systematic review of honey uses and its potential value within oncology care. *J Clin Nurs.* Oct;17(19):2604-23, 2008.

BATIST G, TULPUL A, SINHA BK, KATKI AG, MEYERS CE, COWAN KH. Overexpression of a novel anionic glutathione transferase in multidrug-resistant human breast cancer cells, *J. Biol. Chem.*, 261, 15544, 1986

BECK SA, GROUNDWATER P, BARTON C, TISDALE MJ. Alterations in serum lipolytic activity of cancer patients with response to therapy. *Br J Cancer* 62: 822–825, 1990.

BEN-YOSEPH O, ROSS BD. Oxidation therapy: the use of a reactive oxygen species generating enzyme system for tumour treatment, *Br. J. Cancer* 70:1131–1135, 1994.

BERTZ RJ, GRANNEMAN GR. Use of in vitro and in vivo data to estimate the likelihood of metabolic pharmacokinetic interactions. *Clin Pharmacokinet*; 32: 210–58, 1997.

BING C, RUSSELL S, BECKET E, POPE M, TISDALE MJ, TRAYHURN P, JENKINS JK. Adipose atrophy in cancer cachexia: morphologic and molecular analysis of adipose tissue in tumour-bearing mice. *Br J Cancer* 95: 1028–1037, 2006.

BORNER MM, BROUSSET P, PFANNER-MEYER B, BACCHI M, VONLANTHEN S, HOTZ MA, ALTERMATT HJ, SCHLAIFER D, REED JC, BETTICHER DC. Expression of apoptosis regulatory proteins of the Bcl-2 family and p53 in primary resected non-small-cell lung cancer. *Br. J. Cancer*; 79:952–958, 1999.

BOUDREAU MD, BELAND FA. An Evaluation of the Biological and Toxicological Properties of *Aloe Barbadensis* (Miller), *Aloe Vera*. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, 24: 1, 103-154, 2006.

BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal Biochem*, 72:248-254, 1976.

BRAGANHOL E, ZAMIN LL, CANEDO D, *et al.* Antiproliferative effect of quercetin in the human U138MG glioma cell line. *Anti-Cancer Drugs*, vol. 17, no. 6, pp. 663–671, 2006.

BRENNER C, GRIMM S. The permeability transition pore complex in cancer cell death. *Oncogene*; 25:4744-56, 2006.

BRENNAN MF. Uncomplicated starvation versus cancer cachexia. *Cancer Res*; 37:2359, 1986.

BRÖKER LE, KRUYT FAE & GIACCONE G. Cell Death Independent of Caspases: A Review. *Clin Cancer Res* 2005;11(9)May 1, 2005.

BROWN MW, SINGH AK. Alkaline phosphatase level increase with initiation of hormone therapy for prostate cancer portends poor prognosis with rapid progression to bone metastases: a case report and review of the literature. *Clin Genitourin Cancer*. Mar;4(4):293-5, 2006.

BRUSICK D, MENGES U. Assessment of the genotoxic risk from laxative senna products. *Environ Mol Mutagen* 29:1-9, 1997.

BUCK M, CHOJKIER M. Muscle wasting and dedifferentiation induced by oxidative stress in a murine model of cachexia is prevented by inhibitors of nitric oxide synthesis and antioxidants. *EMBO J* 1996;15: 1753 – 65.

- BUDANOV AV, KARIN M. p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling. *Cell* 134: 451–460, 2008.
- BULLER AL, CLAPPER ML, TEW KD. Glutathione S-transferases in nitrogen mustard-resistant and -sensitive cell lines, *Mol. Pharmacol.* 31, 575, 1987.
- BUSBRIDGE J, DASCOMBE MJ, HOOPKINS S. Acute central effects of interleukin-6 on body temperature, thermogenesis and food intake in the rat. *Proc Nutr Soc*; 38:48a, 1989.
- BUSH C, PRICE P, NORTON J, PARKINS CS, BAILEY MJ, BOYD J, JONES CR, A'HERN RP, HORWICH A. Proliferation in human bladder carcinoma measured by Ki-67 antibody labelling: its potential clinical importance. *Br J Câncer*, 64:357–60, 1991.
- BUSQUETS S, DEANS C, FIGUERAS M, MOORE-CARRASCO R, LOPEZ-SORIANO FJ, FEARON KCH, ARGILES JM. Apoptosis is present in skeletal muscle of cachectic gastro-intestinal cancer patients. *Clin Nutr* 26: 614–618, 2007.
- BUZZAI M, JONES RG, AMARAVADI RK, LUM JJ, DEBERARDINIS RJ, ZHAO F, VIOLET B, THOMPSON, CB. Systemic treatment with the antidiabetic drug metformin selectively impairs p53-deficient tumor cell growth. *Cancer Res.* 67: 6745–6752, 2007.
- CAMPLEJOHN RS, GILCHRIST R, EASTON D, MCKENZIE-EDWARDS E, BARNES DM, ECCLES DM, ARDERN-JONES A, HODGSON SV, DUDDY PM, EELES RA. Apoptosis, ageing and cancer susceptibility. *Br J Cancer* 88:487–490, 2003.
- CATAPANO AL. Antioxidant effect of flavonoids. *Angiology*, vol. 48, no. 1, pp. 39–44, 1997.
- CHIANG L-C, NG LT, LIN IC, KUO PL, LIN CC. Antiproliferative effect of apigenin and its apoptotic induction in human Hep G2 cells. *Cancer Letters*, vol. 237, no. 2, pp. 207–214, 2006.
- CHINTHALAPALLY V, DHIMANT D, BARBARA S, NALINI K, SHANTU A, BANDARU R. Inhibitory effect of caffeic acid esters on azoxymethane-induced biochemical changes and aberrant crypt foci formation in rat colon. *Cancer Res.* 53: 4182–8, 1993.
- CHOI EJ, BAE SM, AHN WS. Antiproliferative effects of quercetin through cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer MDA-MB-453 cells. *Archives of Pharmacal Research*; 31, no. 10: 1281–1285, 2008.
- CHOI SW, SON BW, SON YS, PARK YI, LEE SK, CHUNG MH. The wound-healing effect of a glycoprotein fraction isolated from *Aloe vera*. *Br J Dermatol*; 145:535–545, 2001.
- CHOI S & CHUNG M-H. A review on the relationship between *Aloe vera* components and their biologic effects. *Seminars in Integrative Medicine* Volume 1, Pags 53-62, 2003.
- CHOJKIER M. Inhibition of Albumin Synthesis in Chronic Diseases - Molecular Mechanisms. *J Clin Gastroenterol.* Volume 39, Sup. 2, S143-S146, 2005.
- CLAPPER ML & TEW KD. Identification of a glutathione S-transferase associated with microsomes of tumor cell resistant to nitrogen mustards. *Biochem. Phurmacol.*, 38, 1915, 1989.

COHEN G, DEMBIEC D, MARCUS J. Measurement of catalase activity in tissue extracts. *Analytical Biochem.* 34: 30-38, 1970.

COLE SPC, DOWNES HF, MIRSKI SEL, CLEMENTS DJ. Alterations in glutathione and glutathione-related enzymes in a multidrug-resistant small cell lung cancer cell line. *Mol. Pharmacol.*, 37, 192, 1990.

CONNAN F, LIGHTMAN SL, LANDAU S *et al.* An investigation of hypothalamic–pituitary–adrenal axis hyperactivity in anorexia nervosa: The role of CRH and AVP. *J Psychiatr Res*; 41:131–143, 2007.

COOK NC & SAMMAN S. Flavonoids—chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 7, no. 2, pp. 66–76, 1996.

DAI Y & GRANT S. Targeting Multiple Arms of the Apoptotic Regulatory Machinery. *Cancer Res* 2007; 67: (7).April 1, 2007.

DANG CV & SEMENZA, GL. Oncogenic alterations of metabolism. *Trends Biochem. Sci.* 24: 68–72, 1999.

DEBERARDINIS RJ, LUM JJ, HATZIVASSILIOU G, THOMPSON CB. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab* 7:11–20, 2008.

DE PAEPE B. Anti-angiogenic agents and cancer: current insights and future perspectives. *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* Jun;4(2):180-5, 2009.

DE WYS WD, BEGG C, LAVIN PT *et al.* Prognostic effect of weight loss prior to chemotherapy in cancer patients. Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Med*;69:491–497, 1980.

DE WYS WD. Weight loss and nutritional abnormalities in cancer patients: incidence, severity and significance. *Calman K, Fearon KCH, eds. Clinics in oncology*, Vol. 5. Londres: W.B. Saunders, 251, 1986.

DOUMAS BT, WATSON WA, BIGGS HG. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clin Chim Acta* 31(1):87-96, 1971.

DROTT C, SVANINGER G, LUNDHOLM K. Increased urinary excretion of cortisol and catecholamines in malnourished cancer patients. *Ann Surg* 208: 645–650, 1988.

ESUAA MF, RAUWALDB J-W. Novel bioactive maloyl glucans from Aloe vera gel: isolation, structure elucidation and in vitro bioassays. *Carbohydrate Research*; 341:355–364, 2006.

ELSTROM RL, BAUER DE, BUZZAI M., KARNAUSKAS R, HARRIS MH, PLAS DR, ZHUANG H, CINALLI RM, ALAVI A, RUDIN CM, *et al.* Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Res.* 64: 3892–3899, 2004.

EMERY PW. Cachexia in experimental models. *Nutrition.* Jul-Aug;15(7-8):600-3, 1999.

EMPRESA BRALISEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). <http://www.embrapa.br>, acessado em 07/08/2008.

EVGENY N. IMYANITOV. Gene polymorphisms, apoptotic capacity and cancer risk. *Hum Genet* 125:239–246, 2009.

FAHEY JW, STEPHENSON KK. Pinostrobin from Honey and Thai Ginger (*Boesenbergia pandurata*): A Potent Flavonoid Inducer of Mammalian Phase 2 Chemoprotective and Antioxidant Enzymes. *J. Agric. Food Chem.*, 50 (25), 7472-7476, 2002.

FANG J, NAKAMURA H, IYER AK. Tumor-targeted induction of oxystress for cancer therapy. *Journal of drug targeting*, August–September; 15(7–8): 475–486, 2007.

FANG J, SAWA T, AKAIKE T, AKUTA T, SAHOO SK, GREISH K, HAMADA A, MAEDA H. In vivo antitumor activity of pegylated zinc protoporphyrin: targeted inhibition of heme oxygenase in solid tumor, *Cancer Res.* 63 3567–3674, 2003.

FANG J, SAWA T, AKAIKE T, MAEDA H. Tumor-targeted delivery of polyethylene glycol-conjugated D-amino acid oxidase for antitumor therapy via enzymatic generation of hydrogen peroxide, *Cancer Res.* 62, 3138–3143, 2002.

FANG J, SEKI T, MAEDA H. Therapeutic strategies by modulating oxygen stress in cancer and inflammation. *Advanced Drug Delivery Reviews*; 61:290–302, 2009.

FAUSTO N, CAMPBELL JS, RIEHLE KJ. Liver regeneration. *Hepatology*; 43:S45-S5, 2006.

FEARON KCH. The mechanisms and treatment of weight loss in cancer. *Proc Nutr Soc* 51: 251–265, 1992.

FERNADES-JUNIOR HJ, BIFULCO, VA, BARBOZA AB (coordenadores). Câncer: uma visão multiprofissional. Minha Editora – Barueri/SP, 2010, pag 2.

FERNANDES LC, MACHADO UF, NOGUEIRA CR, CARPINELLI AR, CURI R. Insulin secretion in Walker 256 tumor cachexia. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 258: E1033–E1036, 1990.

FIELD KM, DOW C, MICHAEL M. Part I: Liver function in oncology: biochemistry and beyond. *Lancet Oncol*; 9: 1092–101, 2008.

FOGLEMEN RW, CHAPDELAINE JM, CARPENTER RH, MCANALLEY BH. Toxicologic evaluation of injectable acemannan in the mouse, rat and dog. *Vet Hum Toxicol.* Jun;34(3):201-5, 1992.

FOGLIENI C, MEONI C, DAVALLI AM. Fluorescent dyes for cell viability: an application on prefixed conditions. *Histochem Cell Biol*, 115:223–229, 2001.

FRUEHAUF JP, MEYSKENS JR FL. Reactive Oxygen Species: A Breath of Life or Death? *Clin Cancer Res*; 13(3) February 1: 789-794, 2007.

FURUYA M, YONEMITSU Y, AOKI I. III. Angiogenesis: Complexity of Tumor Vasculature and Microenvironment. *Current Pharmaceutical Design*, 15, 1854-1867, 2009.

GAD SC & WEIL CS. Statistic for toxicologists. In: Wallace H (editor), *Principles and Methods of toxicology*. Raven Press Ltda., New York, 221-274, 1994.

GALIJATOVIC A, OTAKE Y, WALLE UK, & WALLE T. Induction of UDP-glucuronosyltransferase UGT1A1 by the flavonoid chrysin in Caco-2—Potential role in carcinogen bioinactivation. *Pharmaceutical Research*, 18, 374–379, 2001.

GATENBY RA & GILLIES RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat. Rev. Cancer* 4: 891–899, 2004.

GAZZANIGA P, GRADILONE A, VERCILLO R, GANDINI O, SILVESTRI I, NAPOLITANO M, *et al.* Bcl-2/bax mRNA expression ratio as prognostic factor in lowgrade urinary bladder cancer. *Int J Cancer*; 69:100–4, 1996.

GBADEGESIN MA, ODUNOLA OA, AKINWUMI KA, OSIFESO OO. Comparative hepatotoxicity and clastogenicity of sodium arsenite and three petroleum products in experimental Swiss Albino Mice: The modulatory effects of *Aloe vera* gel. *Food and Chemical Toxicology*; 47:2454–2457, 2009.

GELIN J, MOLDAWER LL, LONNROTH C, SHERRY B, CHIZZONITE R, LUNDHOLM K. Role of endogenous tumor necrosis factor α and interleukin 1 for experimental tumor growth and the development of cancer cachexia. *Cancer Res*;51:415 – 21, 1991.

GHELDOLF WANG XH, ENGESETH NJ. Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. *J. Agric. Food Chem.* 50, 5870-5877, 2002.

GOMES MCC, BEVILACQUA RG, LIMA-GONÇALVES E, RESENDE L. Modelo experimental de avaliação do desenvolvimento do tumor maligno. *Cien. Cult.*, 35(7): 736, 1983.

GOMES-MARCONDES MC, TISDALE MJ. Induction of protein catabolism and the ubiquitin-proteasome pathway by mild oxidative stress. *Cancer Lett.* 6;180(1):69-74, 2002.

GOODLAD GA, CLARK CM. Alterations in hepatic 5'-nucleotidase in the tumor-bearing rat. *Enzyme*; 27(2):119-23, 1982.

GOULART MG, MATTOS FILHO TR. Efeitos do Verapamil (Dilacorón), bloqueador dos canais de cálcio, na regeneração do fígado de ratos após hepatectomia parcial. Tese de doutorado. Campinas, 2003.

GRAÑA X & REDDY EP. Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin-dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). *Oncogene* 11: 211–219, 1995.

GRIBEL' NV, PASHINSKII VG. Antimetastatic properties of aloe juice. *Vopr Onkol.*;32(12):38-40, 1986.

GRIBEL' NV, PASHINSKII VG. The antitumor properties of honey. *Vopr Onkol.*;36(6):704-9, 1990.

GRIMM D, BAUER J, SCHOENBERGER J. Blockade of neoangiogenesis, a new and promising technique to control the growth of malignant tumors and their metastases. *Curr Vasc Pharmacol.* Jul;7(3):347-57, 2009.

- GRINDLAY D, REYNOLDS T. The *Aloe vera* phenomenon: a review of the properties and modern uses of the leaf parenchyma gel. *J Ethnopharmacol*. Jun;16(2-3):117-51, 1986.
- HALL A. The Cytoskeleton And Cancer. *CANCER METASTASIS REV* 28:5–14, 2009.
- HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC (Eds.). *Free Radicals In Biology And Medicine*. Oxford University Press, Nj, USA, pp. 617–859, 1999.
- HAMZAOGLU I, SARIBEYOGLU K, DURAK H, KARAHASANOGLU T, BAYRAK I, ALTUG T, 'SIRIN F, SARIYAR M. Protective covering of surgical wounds with honey impedes tumor implantation. *Arch surg*; 135:1414-1417, 2000.
- HANAHAN D, WEINBERG RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57–70, 2000.
- HARRIS C, PIERCE K, KING G, YATES KM, HALL J, TIZARD I. Efficacy of acemannan in treatment of canine and feline spontaneous neoplasms. *Mol Biother*. Dec;3(4):207-13, 1991.
- HEITKAMP K, BUSCH-STOCKFISCH M. [The pros and cons of honey--are statements about the effects of honey "scientifically verified"?]. *Z Lebensm Unters Forsch*. Apr;182(4):279-86, 1986.
- HENRY,R.J. Determination of serum protein by biuret reaction. In: *Clinical chemistry principles and technics*. 2ed. Hagerstown, Harper & How, p.413, 1974.
- HERZIG M & CHRISTOFORI G. Recent advances in cancer research: mouse models of tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta*. Jun 21;1602(2):97-113, 2002.
- HILDENBRAND GL, HILDENBRAND LC, BRADFORD K, CAVIN SW. Fiveyear survival rates of melanoma patients treated by diet therapy after the manner of Gerson: a retrospective review. *Altern Ther Health Med*; 1: 29–37, 1995.
- HOLLANDER DM, EBERT EC, ROBERTS AL, DEVEREUX DF. Effects of tumor type and burden on carcass lipid depletion in mice. *Surgery* 100: 292–296, 1986.
- HONNOR, A. The management of chronic oedema in palliative care. *Br J Community Nurs*. Oct;13(10):S4-9, 2008.
- HU, Y.; XU, J.; HU, Q. Evaluation of Antioxidant Potential of *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) Extracts. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 7788-7791, 2003.
- HUANG P, FENG L, OLDHAM EA, KEATING ML, PLUNKETT W. Superoxide dismutase as a target for the selective killing of cancer cells, *Nature* 407; 390–395, 2000.
- IKENO Y, HUBBARD GB, LEE S, YU BP, HERLIHY JT. The influence of long-term *Aloe vera* ingestion on age-related disease in male Fischer 344 rats. *Phytother Res*. Dec;16(8):712-8, 2002.
- IMYANITOV E, HANSON K, ZHIVOTOVSKY B. Polymorphic variations in apoptotic genes and cancer predisposition. *Cell Death DiVer* 12:1004–1007, 2005.

ISHIKO O, SUMI T, HIRAI K, HONDA K, NAKATA S, YOSHIDA H, OGITA S. Apoptosis of muscle cells causes weight loss prior to impairment of DNA synthesis in tumor-bearing rabbits. *Jpn J Cancer Res* 92: 30–35, 2001.

JAGANATHAN SK & MANDAL M. Antiproliferative Effects of Honey and of Its Polyphenols: A Review. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2009a.

JAGANATHAN SK & MANDAL M. Honey constituents and its apoptotic effect in colon cancer cells. *Journal of Apiprodukt and Apimedical Science*, vol. 1, pp. 29–36, 2009b.

JEDDAR A, KHASSANY A, RAMSAROOP VG, BHAMJEI IE, MOOSA A. The antibacterial action of honey: an in vitro study. *S. Afr. Med. J.* **67**: 257–9. 1985.

JEONG HJ, SHIN YG, KIM IH, & PEZZUTO JM. Inhibition of aromatase activity by flavonoids. *Archives of Pharmacal Research*, 22, 309–312, 1999.

JOCKEN JWE, BLAAK EE. Catecholamine-induced lipolysis in adipose tissue and skeletal muscle in obesity. *Physiol Behav* 94: 219–230, 2008.

JONES RG, THOMPSON CB. Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *GENES & DEVELOPMENT* 23:537–548, 2009.

KAMETANI S, KOJIMA-YUASA A, KIKUZAKI H, KENNEDY DO, HONZAWA M and MATSUI-YUASA I, “Chemical Constituents of Cape Aloe and Their Synergistic Growth-Inhibiting Effect on Ehrlich Ascites Tumor Cells”, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, Vol. 71, 1220-1229, 2007.

KAO YC, ZHOU C, SHERMAN M, LAUGHTON CA, CHEN S. Molecular basis of the inhibition of human aromatase (estrogen synthetase) by flavone and isoflavone phytoestrogens: A site-directed mutagenesis study. *Environmental Health Perspectives*, 106, 85–92, 1998.

KING GK, YATES KM, GREENLEE PG, PIERCE KR, FORD CR, MCANALLEY BH, TIZARD IR. The effect of Acemannan Immunostimulant in combination with surgery and radiation therapy on spontaneous canine and feline fibrosarcomas. *J Am Anim Hosp Assoc*. Sep-Oct;31(5):439-47, 1995a.

KING KL, CIDLOWSKI JA. Cell cycle and apoptosis: common pathways to life and death. *J Cell Biochem*. 58:175-80, 1995b.

KIM S-H, CHEON HJ, YUN N, OH S-T, SHIN E, SHIM KS, LEE SM. Protective Effect of a Mixture of Aloe vera and Silybum marianum Against Carbon Tetrachloride-Induced Acute Hepatotoxicity and Liver Fibrosis. *J Pharmacol Sci* 109, 119 – 127, 2009.

KIRKEBY S, MOE D. Biochemical and histochemical studies on alkaline phosphatase in normal and dystrophic muscle. *Exp Pathol*; 27(3):131-6, 1985.

KRAJEWSKA M, KRAJEWSKI S, EPSTEIN JI, SHABAIK A, SAUVAGEOT J, SONG K, KITADA S, REED JC. Immunohistochemical analysis of bcl-2, bax, bcl-X, and mcl-1 expression in prostate cancers. *Am. J. Pathol.*; 148:1567–1576, 1996.

KUNG JWC, FORBES SJ. Stem cells and liver repair. *Current Opinion in Biotechnology*; 20:568–574, 2009.

KWON KH, BARVE A, YU S, HUANG MT, KONG AN. Cancer chemoprevention by phytochemicals: potential molecular targets, biomarkers and animal models. *Acta Pharmacol Sin.* Sep;28(9):1409-21, 2007.

LEE CH, INOKI K, KARBOWNICZEK M, PETROULAKIS E, SONENBERG N, HENSKE EP, GUAN KL. Constitutive mTOR activation in TSC mutants sensitizes cells to energy starvation and genomic damage via p53. *EMBO J.* 26: 4812–4823, 2007.

LEE HZ, HSU SL, LIU MC, *et al.* Effects and mechanisms of aloe-emodin on cell death in human lung squamous cell carcinoma. *Eur J Pharmacol* 431:287-295, 2001a.

LEE HZ. Protein kinase C involvement in aloe-emodin and emodin-induced apoptosis in lung carcinoma cell. *Br J Pharmacol* 134:1093-1103, 2001b.

LEE KW, CHUN KS, LEE JS, KANG KS, SURH YJ, LEE HJ. Inhibition of cyclooxygenase-2 expression and restoration of gap junction intercellular communication in h-rastransformed rat liver epithelial cells by caffeic acid phenethyl ester. *Ann Ny Acad Sci* 1030:501–7, 2004.

LEE, KY, WEINTRAUB, ST, YU BP. Isolation and identification of a phenolic antioxidant from *Aloe Vera barbadensis*. *Free Radical Biol. Med.*, 28, 261-265, 2000.

LEIST M, GANTNER F, JILG S, WENDEL A. Activation of the 55 kDa TNF receptor is necessary and sufficient for TNF-induced liver failure, hepatocyte apoptosis, and nitrite release. *J Immunol.*;154:1307–1316, 1995.

LETAI AG. Diagnosing and exploiting cancer's addiction to blocks in apoptosis. *Nat Rev Cancer* 8:121–132, 2008.

LEVINE AM, ROSENBERG SA. Alkaline phosphatase levels in osteosarcoma tissue are related to prognosis. *Cancer.* Dec;44(6):2291-3, 1979.

LIN J-G, CHEN G-W, LI T-M, CHOUH S-T, TAN T-W AND CHUNG J-G. Aloe-Emodin Induces Apoptosis in T24 Human Bladder Cancer Cells Through the p53 Dependent Apoptotic Pathway. *THE JOURNAL OF UROLOGY®*; Vol. 175, 343-347, January 2006.

LING-FEI WU, GUO-PING LI, JIA-LIN FENG, ZE-JIN PU. Molecular mechanisms of adenosine-induced apoptosis in human HepG2 cells. *Acta Pharmacologica Sinica* Apr; 27 (4): 477–484, 2006.

LISSONI P, ROVELLI F, BRIVIO F, ZAGO R, COLCIAGO M, MESSINA G, MORA A, PORRO G. A Randomized Study of Chemotherapy Versus Biochemotherapy with Chemotherapy plus *Aloe arborescens* in Patients with Metastatic Cancer. *in vivo* 23: 171-176, 2009.

LIU C, LOU Y, LIZÉE G, QIN H, LIU S, RABINOVICH B, KIM GJ, WANG H, YE Y, SIKORA AG, OVERWIJK WW, LIU Y, WANG G AND HWU P. Plasmacytoid dendritic cells induce NK cell-dependent, tumor antigen-specific T cell cross-priming and tumor regression in mice. *J. Clin. Invest.* 118(3): 1165-1175, 2008.

LOKU K, TSUSHIDA T, TAKEI Y, NAKATANI N, TERAOKA J. Antioxidant activity of quercetin monoglucosides in solution and phospholipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta*, vol.1234, pp. 99–104, 1995.

LORITE MJ, SMITH HJ, ARNOLD JA, MORRIS A, THOMPSON MG, TISDALE MJ. Activation of ATP-ubiquitin-dependent proteolysis in skeletal muscle in vivo and murine myoblasts in vitro by a proteolysis inducing factor (PIF). *Br J Cancer* 85: 297–302, 2001.

MABROUK GM, MOSELHY SS, ZOHNY SF, ALI EM, HELAL TE, AMIN AA, KHALIFA AA. Inhibition of methylnitrosourea (MNU) induced oxidative stress and carcinogenesis by orally administered bee honey and Nigella grains in Sprague Dawely rats. *J Exp Clin Cancer Res. Sep;21(3):341-6*, 2002.

MAJID A, TSOUKAKIS O, WALEWSKA R, GESK S, SIEBERT R, KENNEDY DB, DYER MJ. BCL2 expression in chronic lymphocytic leukemia: lack of association with the BCL2 938A>C promoter single nucleotide polymorphism. *Blood* 111:874–877, 2008.

MAJNO G, JORIS I. Apoptosis, Oncosis, and Necrosis. An Overview of Cell Death. *American Journal of Pathology*, Vol. 146, No. 1, January, 1995.

MANTOVANI G, MACCIO A, LAI P, MASSA E, GHIANI M, SANTONA MC. Cytokine activity in cancer-related anorexia/cachexia: role of megestrol acetate and medroxyprogesterone acetate. *Semin Oncol;25: 45 – 52*, 1998.

MANTOVANI G, MACCIO A, MADEDDU C, *et al.* Quantitative evaluation of oxidative stress, chronic inflammatory indices and leptin in câncer patients: correlation with stage and performance status. *Int J Câncer; 98:84 – 91*, 2002.

MANTOVANI G, MADEDDU C, MACCIO A, GRAMIGNANO G, LUSSO MR, MASSA E, ASTARA G, SERPE R. Cancer-Related Anorexia/Cachexia Syndrome and Oxidative Stress: An Innovative Approach beyond Current Treatment. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13(10) 1651-59, 2004.

MARCONDES TC, CRUZ BLG, SALOMÃO EM, GOMES-MARCONDES MCC. Leucine-rich diet and ascorbic acid affect the proteolysis-inducing factor level and the muscle antioxidant stress response in tumor-bearing rats. *Cytokine, Volume 43, Issue 3, Page 258*, 2008.

MARNETT LJ. Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research* 424:83–95, 1999.

MARNETT LJ. Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. *Toxicology* 181-182:219-222, 2002.

MARTINS, M.J.; NEGRAO, M.R. & HIPOLITO-REIS, C. Alkaline phosphatase from rat liver and kidney is differentially modulated. *Clin Biochem.* 34(6): 463-468, 2001.

MATES JM, PEREZ-GOMEZ C, DE CASTRO IN. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin. Biochem.* 32:595–603, 1999.

MCLAUGHLIN CL, ROGAN GJ, TOU J, BAILE CA, JOY WD. Food intake and body temperature responses of rat to recombinant interleukin 1h and a tripeptide interleukin 1h antagonist. *Physiol Behav;52: 1155 – 60*, 1992.

MCMILLAN DC. Systemic inflammation, nutritional status and survival in patients with cancer. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. May;12(3):223-6, 2009.

MERRIAM EA, CAMPBELL BD, FLOOD LP, WELSH CJR, MCDANIEL HR, BUSBEE DL. Enhancement of immune function in rodents using a complex plant carbohydrate which stimulates macrophage secretion of immunoreactive cytokines. *Advances in Anti-Aging Medicine* 1, 181–203, 1996.

MISHIMA S, ONO Y, ARAKI Y, AKAO Y, NOZAWA Y. Two related cinnamic Acid derivatives from Brazilian honey bee propolis, baccharin and drupanin, induce growth inhibition in allografted sarcoma S-180 in mice. *Biol Pharm Bull*. Jun;28(6):1025-30, 2005.

MOLDAWER LL, GELIN J, SCHERSTEN T, LUNDHOLM KG. Circulating interleukin 1 and tumor necrosis factor during inflammation. *Am J Physiol*; 253:R922 – 8, 1987.

MORRIS-STIFF G, GOMEZ D., PRASAD KR. C-reactive protein in liver cancer surgery. *Eur J Surg Oncol*. jul;34(7):727-9, 2008.

MORTIMER PS. The Pathophysiology of Lymphedema. *CANCER Supplement*. December 15, Volume 83, N° 12; 2798-2802, 1998.

MULLER SO, ECKERT I, LUTZ WK, *et al*. Genotoxicity of the laxative drug components emodin, aloe-emodin and danthron in mammalian cells: Topoisomerase II mediated? *Mutat Res* 371:165-173, 1996.

MUZYKANTOV VR, ATOCHINA EN, ISCHIROPOULOS H, DANILOV SM, FISHER AB. Immunotargeting of antioxidant enzyme to the pulmonary endothelium, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:5213–5218, 1996.

NATIONAL HONEY BOARD (NHB). Honey. <http://www.honey.com>, acessado em 12/12/2009.

NERADIL J, VESELSKA R, SLANINA J. UVC-protective effect of caffeic acid on normal and transformed human skin cells in vitro. *Folia Biologica*, vol. 49, no. 5, pp. 197–202, 2003.

NI Y, TURNER D, YATES KM, TIZARD I. Isolation and characterization of structural components of *Aloe vera* L. leaf pulp. *Int Immunopharmacol*. Dec 20;4(14):1745-55, 2004.

NICHOLSON D W. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. *Nature*, vol 407, 12 october 2000.

NIIZUMA K, ENDO H, CHAN PH. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction as determinants of ischemic neuronal death and survival. *J Neurochem*. May;109 Suppl 1:133-8, 2009.

NISHIKAWA M, HASHIDA M, TAKAKURA Y. Catalase delivery for inhibiting ROS-mediated tissue injury and tumor metastasis. *Advanced Drug Delivery Reviews* 61:319–326, 2009.

NÜCKEL H, FREY UH, BAU M, SELLMANN L, STANELLE J, DÜRIG J, JÖCKEL KH, DÜHRSEN U, SIVERT W. Association of a novel regulatory polymorphism (-938C>A) in the BCL2 gene promoter with disease progression and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 109:290–297, 2007.

OLIVEIRA DE & BACCHI MM. Infecção pelo vírus de Epstein-Barr (EBV) e vírus do Papiloma Humano (HPV), Expressão da proteína p53 e proliferação celular em carcinomas de nasofaringe e laringe, 2002. 117f. Tese (Doutorado em Patologia) – Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, 2002.

OLTVAI ZN, MILLIMAN CL, KORSMEYER SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*, 74:609–19, 1993.

ORGAZ JL, MARTÍNEZ-POVEDA B, FERNÁNDEZ-GARCÍA NI, JIMÉNEZ B. Following up tumour angiogenesis: from the basic laboratory to the clinic. *Clin Transl Oncol*. Aug;10(8):468-77, 2008.

ORSOLIC N, KNEZEVI A, SVER L, TERZI S, HACKENBERGER BK, BASI I. Influence of honey bee products on transplantable tumours. *Journal of Veterinary and Comparative Oncology*, vol. 1, no. 4, pp. 16–226, 2004.

PECERE T, GAZZOLA MV, MUCIGNAT C, *et al.* Aloe-emodin is a new type of anticancer agent with selective activity against neuroectodermal tumors. *Cancer Res* 60:2800-2804, 2000.

PENG SY, NORMAN J, CURTIN G, CORRIER D, MCDANIEL HR, BUSBEE D. Decreased mortality of Norman murine sarcoma in mice treated with the immunomodulator, Acemannan. *Mol Biother*. Jun;3(2):79-87, 1991.

PERROUD APAS, ACHIMINE R, MONTEIRO DE CASTRO G, *et al.* Cytokine gene expression in Walker 256: a comparison of variants A (agressive) and AR (regressive). *Cytokine*, 36: 123–133; 2006.

PERTILE T, GOMES-MARCONDES MCC. Different tumoral evolution induces increase of proteolysis-inducing factor (PIF) and alteration of the proteolytic system activities in young tumor-bearing rats. *Cytokine*, Volume 43, Issue 3, Page 256, 2008.

PHILLIPS KM, CARLSEN MH, BLOMHOFF R. Total antioxidant content of alternatives to refined sugar. *J Am Diet Assoc*. Jan;109(1):64-71, 2009.

RAJASEKARAN S, SIVAGNANAM K, SUBRAMANIAN S. Antioxidant effect of *Aloe vera* gel extract in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Pharmacological Reports*, 57, 90-96 ISSN 1734-1140, 2005.

REBECA R, BRACHT L, NOLETO GR, MARTINEZ GR, CADENA SMSC, CARNIERI EGS, ROCHA MEM, OLIVEIRA MBM. Production of cachexia mediators by Walker 256 cells from ascitic tumors. *Cell Biochem Funct.*, 2008.

REED JC, MIYASHITA T, KRAJEWSKI S, TAKAYAMA S, AIME-SEMPE C, KITADA S, SATO T, WANG HG, HARIGAI M, HANADA M, KRAJEWSKA M, KOCHER K, MILLAN J, KOBAYASHI H. Bcl-2 family proteins and the regulation of programmed cell death in leukemia and lymphoma. *Cancer Treat. Res.*; 84:31–72, 1996.

REYNOLDS T, DWECK AC. *Aloe vera* leaf gel: a review update. *J Ethnopharmacol*. Dec 15;68(1-3):3-37, 1999.

RIVORY LP, SLAVIERO KA, CLARKE SJ. Hepatic cytochrome P450 3A drug metabolism is reduced in cancer patients who have an acute-phase response. *Br J Cancer*; 87: 277–80, 2002.

RUSSELL ST, TISDALE MJ. Effect of eicosapentaenoic acid (EPA) on expression of a lipid mobilizing factor in adipose tissue in cancer cachexia. *Prostaglandins Leukotrienes Essential Fatty Acids* 72: 409–414, 2005.

RYAN JL, CARROLL JK, RYAN EP, MUSTIAN KM, FISCELLA K, MORROW GR. Mechanisms of cancer-related fatigue. *Oncologist*; 12 Suppl 1:22–34, 2007.

SAINI, A.; AL-SHAINT, N.; STEWART, C.E. Waste management—cytokines, growth factors and cachexia, *Cytokine Growth Factor Rev* 17, pp. 475–486, 2006.

SALAH N, MILLER NJ, PAGANGA G, TIJBURG L, BOLWELL GP, RICE-EVANS C. Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 322, no. 2, pp. 339–346, 1995.

SATO K, AKAIKE T, KOHNO M, ANDO M, MAEDA M. Hydroxyl radical production by H₂O₂ plus Cu,Zn-superoxide dismutase reflects the activity of free copper released from the oxidatively damaged enzyme. *J. Biol. Chem.* 267:25371–25377, 1992.

SAXENA A, MOSHYNKA O, SANKARAN K, VISWANATHAN S, SHERIDAN DP Association of a novel single nucleotide polymorphism, G(-248)A, in the 5'-UTR of BAX gene in chronic lymphocytic leukemia with disease progression and treatment resistance. *Cancer Lett* 187:199–205, 2002

SAWA T, WU J, AKAIKE T, MAEDA H. Tumor-targeting chemotherapy by a xanthine oxidase-polymer conjugate that generates oxygen-free radicals in tumor tissue. *Cancer Res.* 60:666–671, 2000.

SCHÄFFER J, GALLAY O, LADENSTEIN R. Glutathione transferase from bovine placenta. *J Biol Chem.* 263: 17405, 1988.

SCHOLZEN T & GERDES G. The Ki-67 Protein: From the Known and the Unknown. *Journal of Cellular Physiology* 182:311–322, 2000.

SIMIZU S, TAKADA M, UMEZAWA K, IMOTO M. Requirement of caspase-3 (-like) protease-mediated hydrogen peroxide production for apoptosis induced by various anticancer drugs, *J. Biol. Chem.* 273:26900–26907, 1998.

SINGH RP, DHANALAKSHMI S, RAO AR. Chemomodulatory action of *Aloe vera* on the profiles of enzymes associated with carcinogen metabolism and antioxidant status regulation in mice. *Phytomedicine.* Jun;7(3):209–19, 2000.

STARCZYNSKI J, PEPPER C, PRATT G, HOOPER L, THOMAS A, MILLIGAN D, BENTLEY P, FEGAN C. Common polymorphism G(-248)A in the promoter region of the bax gene results in significantly shorter survival in patients with chronic lymphocytic leukemia once treatment is initiated. *J Clin Oncol* 23:1514–1521, 2005.

STEGMAN LD, ZHENG H, NEAL ER, BEN-YOSEPH O, POLLEGIONI L, PILONE MS, ROSS BD. Induction of Cytotoxic oxidative stress by D-alanine in brain tumor cells expressing *Rhodotorula gracilis* D-amino acid oxidase: a cancer gene therapy strategy. *Hum. Gene Ther.* 9:185–193, 1998.

STEHLE G, SINN H, WUNDER A, SCHRENK HH, STEWART JCM, HARTUNG G, MAIER-BORST W, HEENE DL. Plasma protein (albumin) catabolism by the tumor itself-implications for tumor metabolism and the genesis of cachexia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*; 26:77-100, 1997.

STEPHENS NA, SKIPWORTH RJ, FEARON KC. Cachexia, survival and the acute phase response. *Curr Opin Support Palliat Care.* Dec;2(4):267-74, 2008.

STRASSMANN G, FONG M, KENNEY JS, JACOB CO. Evidence for the involvement of interleukin-6 in experimental cancer cachexia. *J Clin Invest*; 89:1681 – 4, 1992.

SUZUKI A, TAKAHASHI T, OKUNO Y, *et al.* Liver damage in patients with colony-stimulating factor-producing tumors. *Am J Med*; 94: 125–32, 1993.

SWELLAM T, MIYANAGA N, ONOZAWA M, HATTORI K, KAWAI K, SHIMAZUI T, AKAZA H. Antineoplastic activity of honey in an experimental bladder cancer implantation model: in vivo and in vitro studies. *Int J Urol.* Apr;10(4):213-9, 2003.

TALMADGEA J, CHAVEZA J, JACOBSA L, MUNGERA C, CHINNAHB T, CHOWB JT, WILLIAMSONB D, YATESB K. Fractionation of *Aloe vera* L. inner gel, purification and molecular profiling of activity. *International Immunopharmacology* 4, 1757–1773, 2004.

TANG B, WANG Y, CHEN ZZ. Catalytic spectrofluorimetric determination of superoxide anion radical and superoxide dismutase activity using N,N-dimethylaniline as the substrate for horseradish peroxidase (HRP). *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* Oct;58(12):2557-62, 2002.

TAYEK JA. A review of cancer cachexia and abnormal glucose metabolism in humans with cancer. *J Am Coll Nutr.* Aug;11(4):445-56, 1992.

TEICHER BA, HOLDEN SA, KELLEY MJ, SHEA TC, CUCCHI CA, ROSOWSKY A, HENNER WD, FREI E. Characterization of a human squamous carcinoma cell line resistant to cisdiamminedichloroplatinum(II), *Cancer Res.*, 47, 388, 1987.

THOMAS A, EL ROUBY S, REED JC, KRAJEWSKI S, SILBER R, POTMESIL M, *et al.* Drug-induced apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia: relationship between p53 gene mutation and bcl-2/bax proteins in drug resistance. *Oncogene*; 12:1055–62, 1996.

TISDALE MJ. Biology of cachexia. *J Natl Cancer Inst*;89:1763–1773, 1997.

TISDALE MJ. Cancer cachexia. *Curr Opin Gastroenterol.*, 2009a.

TISDALE MJ. Catabolic mediators of cancer cachexia. *Curr Opin Support Palliat Care.* Dec;2(4):256-61, 2008.

TISDALE MJ. Mechanisms of cancer cachexia. *Physiol Rev.* Apr;89(2):381-410, 2009b.

- TISDALE MJ. Metabolic Abnormalities in Cachexia and Anorexia. *Nutrition* 16:1013–1014, 2000.
- TISDALE MJ. Molecular pathways leading to cancer cachexia. *Physiology (Bethesda)*; 20:340–348, 2005.
- TISDALE MJ. Tumor–Host Interactions. *Journal of Cellular Biochemistry* 93:871–877, 2004.
- TISDALE MJ. Wasting in cancer. *J Nutr*;129(suppl 1S):243S–246S, 1999.
- TOLEDO MT, GOMES MARCONDES MCC. Placental glycogen metabolism changes during walker tumour growth. *Placenta*; 25:456–62, 2004.
- TOMASIN R. Efeitos preventivos e terapêuticos do composto de *Aloe vera* e mel no tratamento de câncer *in vivo* em ratos. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2007.
- TOTHOVA E, FRICOVA M, STECOVA N, KAFKOVA A, ELBERTOVA, A. High expression of Bcl-2 protein in acute myeloid leukemia cells is associated with poor response to chemotherapy. *Neoplasma*; 49:141–144, 2002.
- TRINDER, P. Determination of blood glucose using on oxidase-peroxidase system with a non carcinogenic chromogen. *J. Clin. Path.*, 22: 158-61, 1969.
- TSUCHIDA S, SATO K. Glutathione transferases and cancer. *Crit Rev Biochem Mol Biol.*; 27(4-5):337-84, 1992.
- VALKO M, RHODES CJ, MONCOLA J, IZAKOVIC M, MAZURA M. Mini-review: Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*; 160:1–40, 2006.
- VALE C.; STEWART L.; TIERNEY J.; UK Coordinating Committee For Cancer Research National register of cancer. Trends in UK cancer trials: results from the UK coordinating committee for cancer research national register of cancer trials. *BR. J. CANCER*. 92(5):811-4, 2005.
- VAUX DL, CORY S, ADAMS JM. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-b cells. *Nature*, 335:440–2, 1988.
- VENTRUCCI G, RAMOS SILVA LG, ROSTON MELLO MA, GOMES MARCONDES MC. Effects of a leucine-rich diet on body composition during nutritional recovery in rats. *Nutrition*. Feb;20(2):213-7, 2004.
- VICKERS AJ, CASSILETH BR. Unconventional therapies for cancer and cancer-related symptoms. *THE LANCET Oncology*; Vol 2 April 226-232, 2001.
- VILLAR E, REDONDO M, RODRIGO I, GARCIA J, AVILA E, MATILLA A. bcl-2 Expression and apoptosis in primary and metastatic breast carcinomas. *Tumour Biol.*; 22, 137–145, 2001.
- VOGELSTEIN B, LANE D, LEVINE AJ. Surfing the p53 network. *Nature* 408: 307–310, 2000.

VOGELSTEIN B. & KINZLER KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat. Med.* 10: 789–799, 2004.

WAGNER BA, BUETTNER GR, BURNS CP. Free radical-mediated lipid peroxidation in cells: oxidizability is a function of cell lipid bis-allylic hydrogen content, *Biochemistry* 33:4449–4453, 1994.

WANG AL & TEW KD. Increased glutathione-S-transferase activity in a cell line with acquired resistance to nitrogen mustards. *Cancer Treat. Rep.*, 69, 677, 1985.

WANG M, DHINGRA K, HITTLEMAN WN, LIEHR JG, DE ANDRADE M, LI D. Lipid peroxidation-induced putative malondialdehyde-DNA adducts in human breast tissues. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 5, 705–710, 1996.

WANG Y, TEICHER BA, SHEA TC, HOLDEN SA, ROSBE KW, AL-ACHI A, HENNER WD. Cross-resistance and glutathione-S-transferase T levels among four human melanoma cell lines selected for alkylating agent resistance. *Cancer Res.*, 49, 6185, 1989.

WARBURG O, POSENER K, NEGELEIN E. On metabolism of tumors. *Biochem Z.* 52:319–344, 1924.

WARBURG O. The metabolism of tumours. Constable: London; 1930. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science* 123:309–314, 1956a.

WARBURG O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 124: 269–270, 1956b.

WATCHORN TM, WADDELL ID, DOWIDAR N, ROSS JA. Proteolysis-inducing factor regulates hepatic gene expression via the transcription factors NF- κ B and STAT3. *FASEB J* 15:562–564, 2001.

WATTENBERG LW. Chemoprevention of cancer by naturally occurring and synthetic compounds. In: Wattenberg LW, Lipkin M, Boone GJ, Kellof (eds). *Cancer Chemoprevention* CRC Press, Boca Ranton; 19–40, 1986.

WILLIMSKY G, BLANKENSTEIN T. Sporadic immunogenic tumours avoid destruction by inducing T-cell tolerance. *Nature* 437:141–6, 2005.

WOO KJ, JEONG YJ, PARK JW, KWON TK. Chrysin-induced apoptosis is mediated through caspase activation and Akt inactivation in U937 leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun.* Dec 24;325(4):1215–22, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). <http://www.who.int/cancer>. Acessado em 09/04/2006

WYLLIE AH. Apoptosis and carcinogenesis. *Eur J Cell Biol.* Jul;73(3):189–97, 1997.

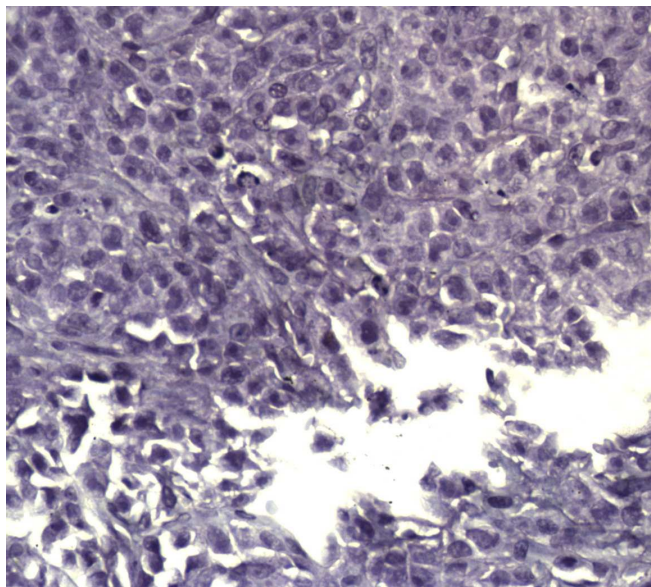
YASMINEH WG, PARKIN JL, CASPERS JI, Theologides A. Tumor necrosis factor/cachectin decreases catalase activity of rat liver. *Cancer Res.* 51:3990–3995, 1991.

YILMAZ M & CHRISTOFORI G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev* 28:15–33, 2009.

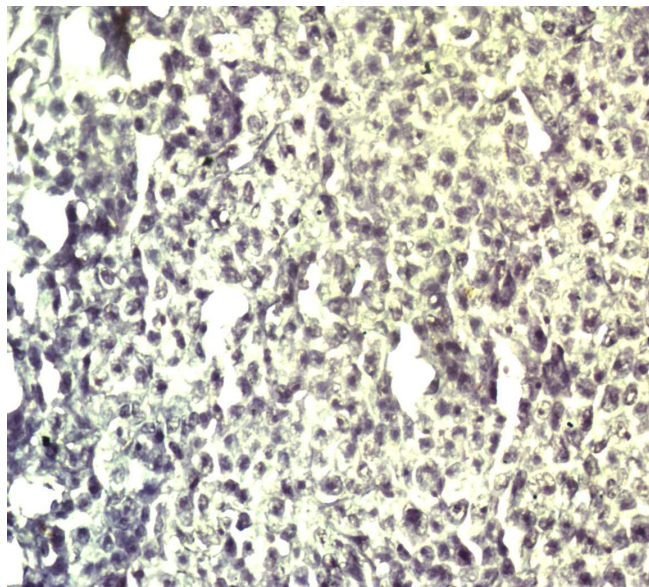
YOSHIKAWA T, KOKURA S, TANAKA K, NAITO Y, KONDO M. A novel cancer therapy based on oxygen radicals. *Cancer Res.* 55:1617–1620, 1995.

ZAGO R. Babosa não é remédio. Mas cura! 3ª Edição - Editora Vozes, 2004.

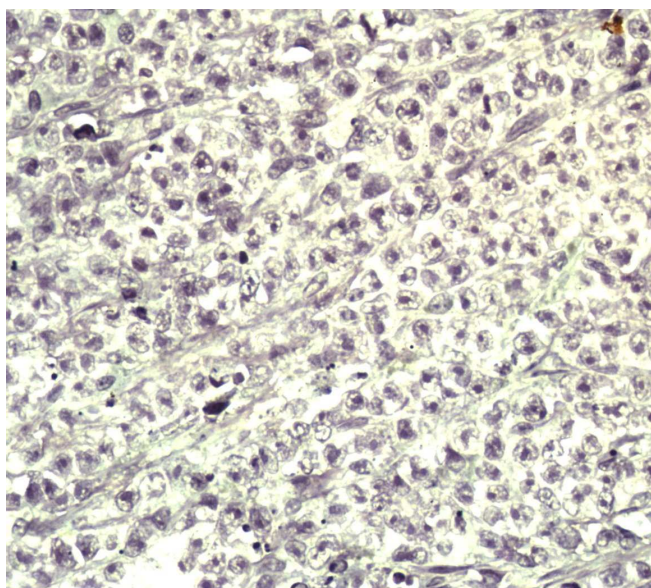
ZICHE M, DONNINI S, MORBIDELLI L. Development of new drugs in angiogenesis. *Curr Drug Targets.* Jul;5(5):485-93, 2004.

11 – ANEXOS:**ANEXO 1:**

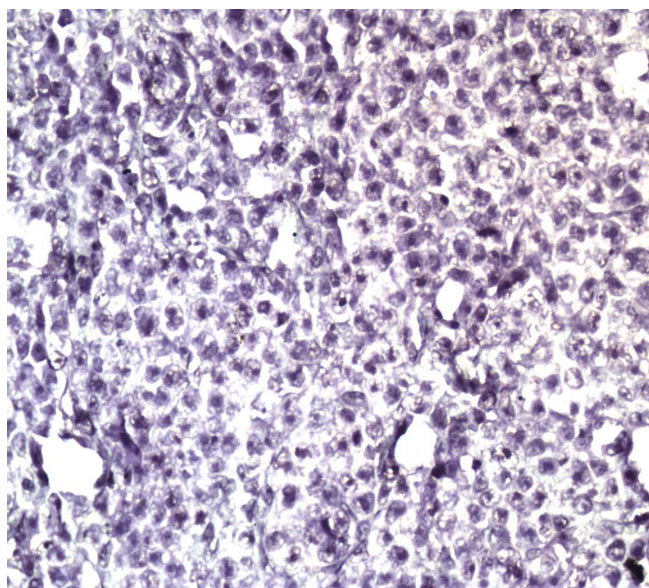
Controle negativo (CW1) Tumor. 400x



Controle negativo (WA1). Tumor. 400x

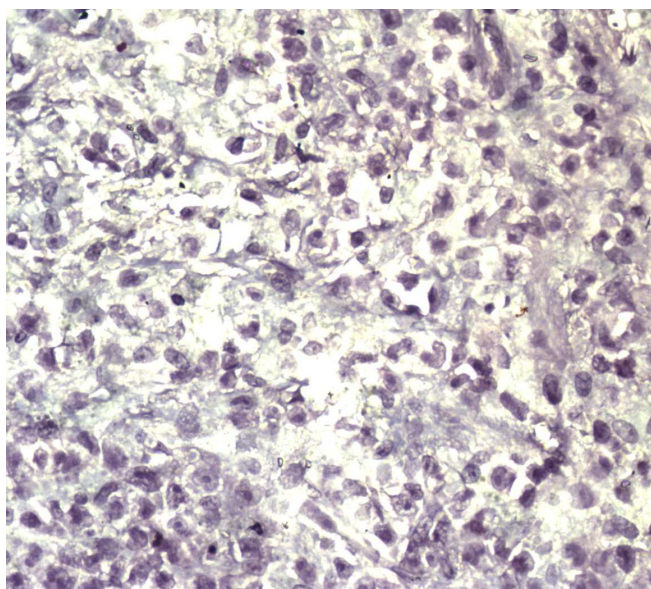
ANEXO 2:

Controle negativo (CW1). Tumor. 400x

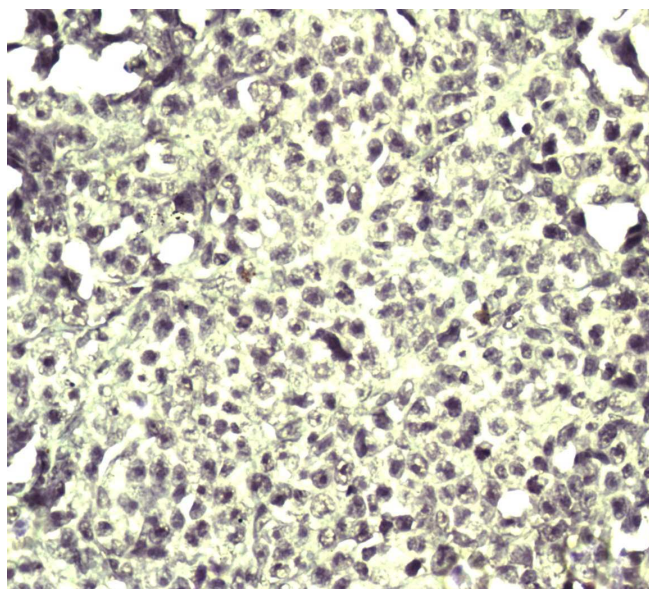


Controle negativo (WA1). Tumor. 400x

ANEXO 3:

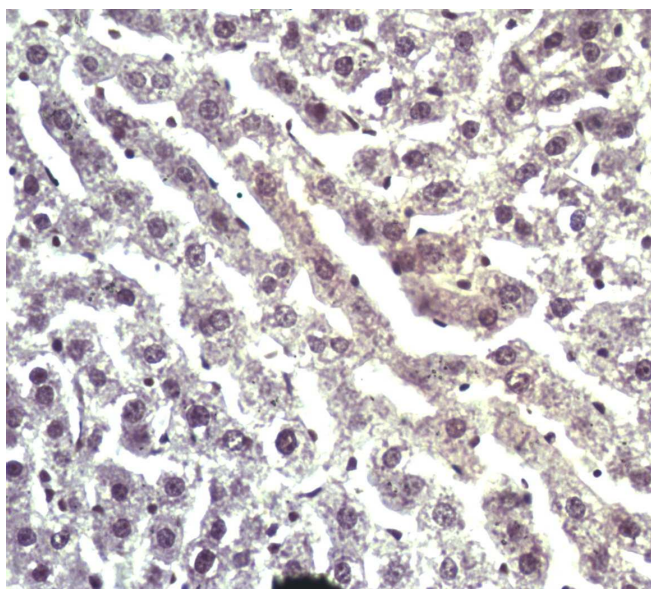


Controle negativo (CW1). Tumor. 400x

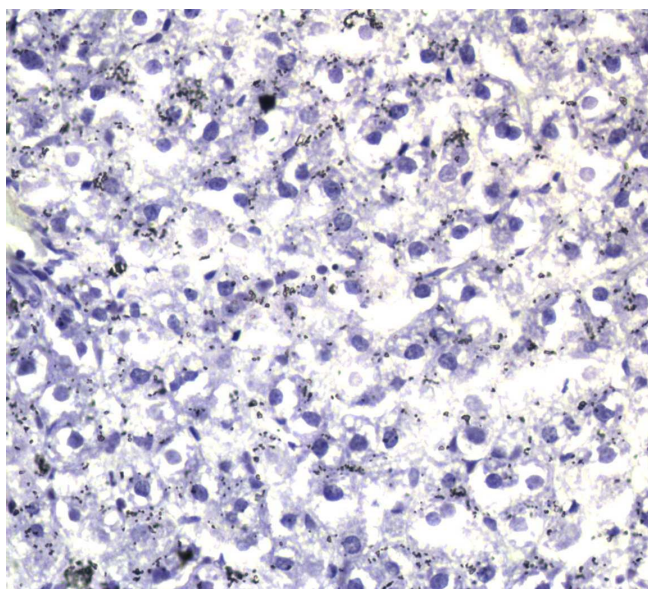


Controle negativo (WA1). Tumor. 400x

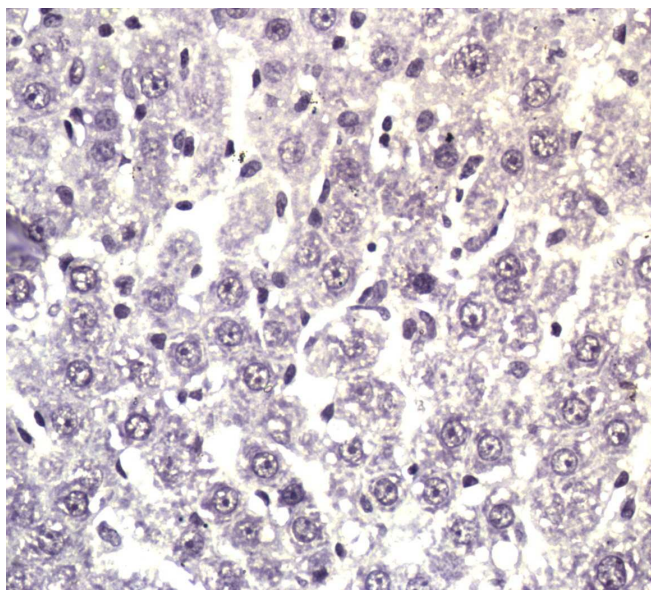
ANEXO 4:



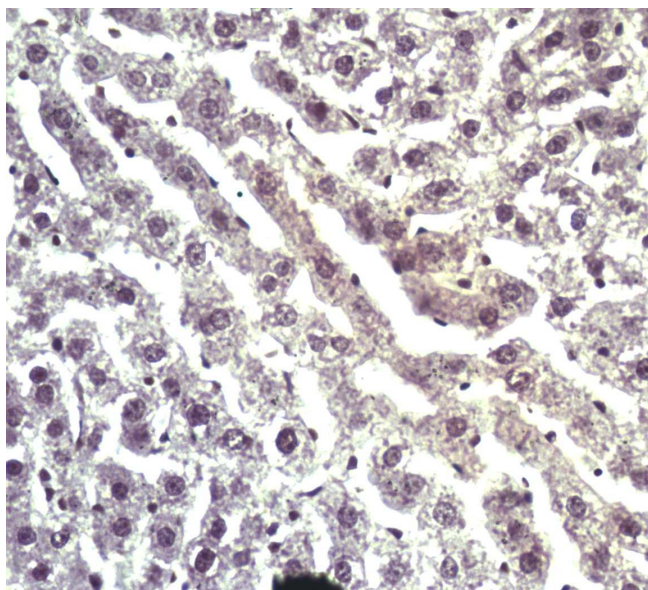
Controle negativo (CC1). Fígado. 400x



Controle negativo (AC1). Fígado. 400x

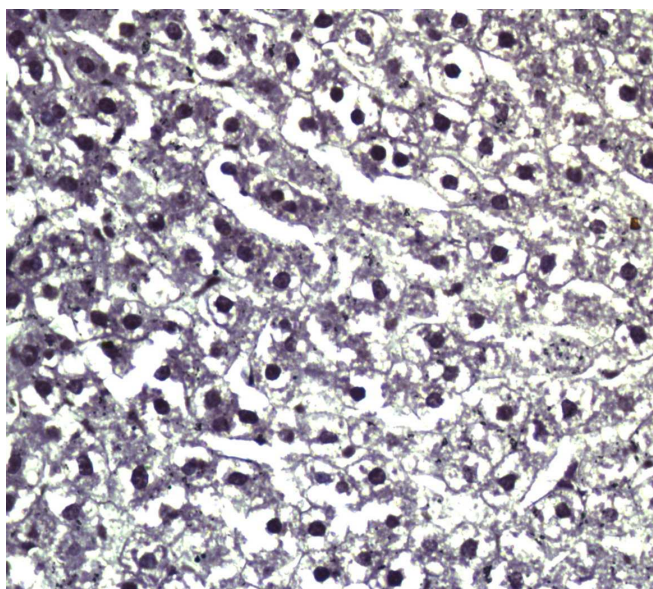


Controle negativo (CW1). Fígado. 400x

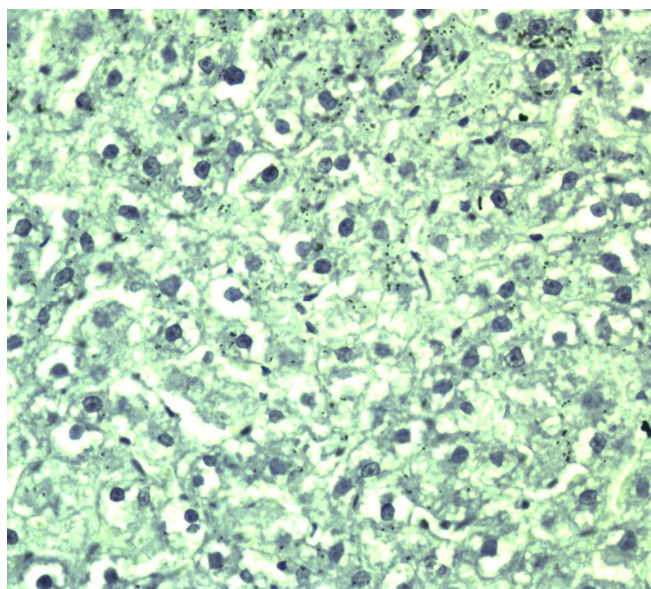


Controle negativo (WA1). Fígado. 400x

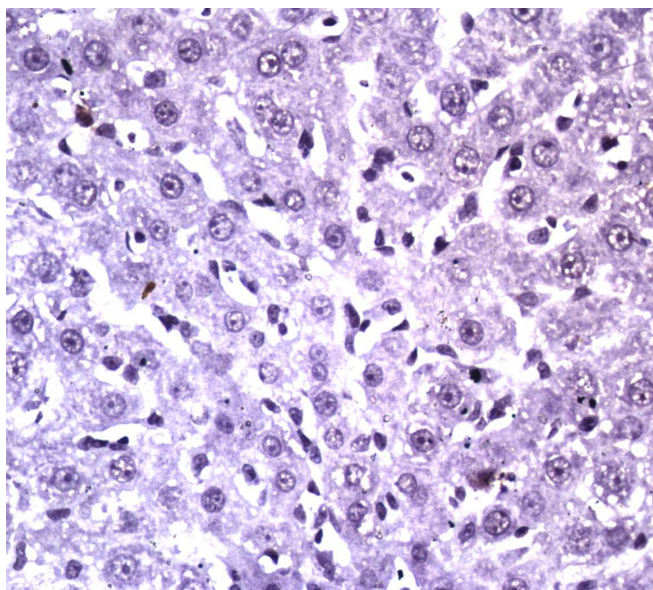
ANEXO 5:



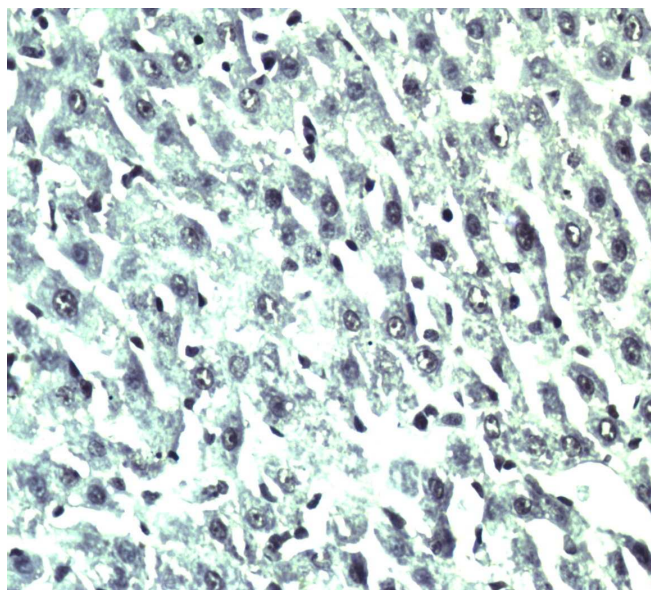
Controle negativo (CC1). Fígado. 400x



Controle negativo (AC1). Fígado. 400x

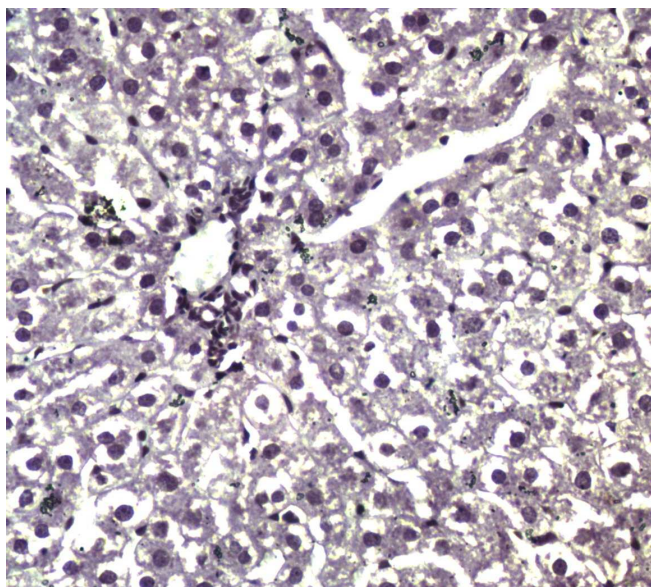


Controle negativo (CW1). Fígado. 400x

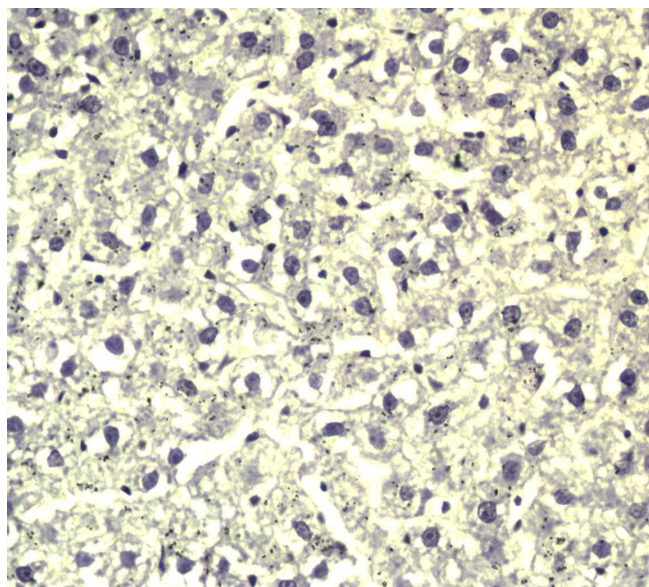


Controle negativo (WA1). Fígado. 400x

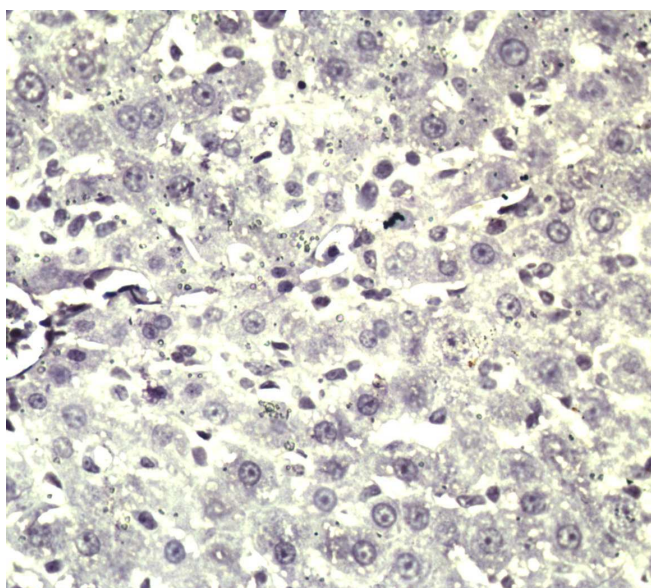
ANEXO 6:



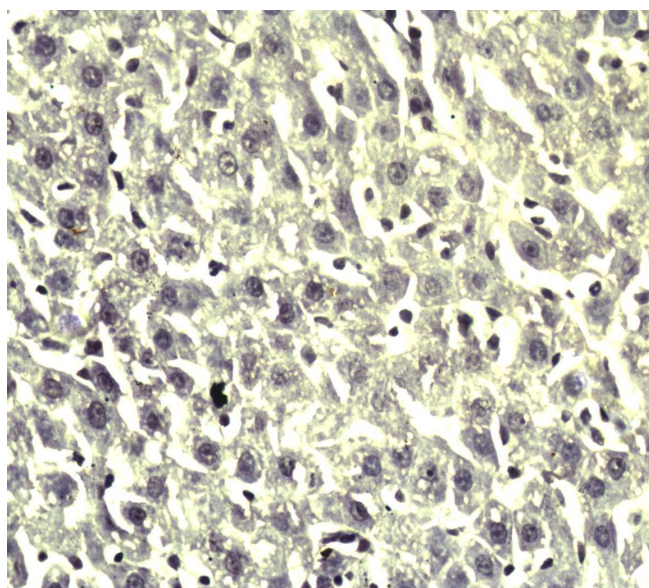
Controle negativo (CC1). Fígado. 400x



Controle negativo (AC1). Fígado. 400x



Controle negativo (CW1). Fígado. 400x



Controle negativo (WA1). Fígado. 400x

ANEXO 7: Protocolo do Comitê de Ética



CEE/Unicamp

**Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEE/Unicamp**


CERTIFICADO

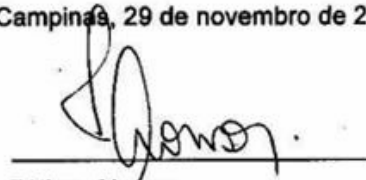
Certificamos que o Protocolo nº 1400-1, sobre "Efeitos preventivos e terapêuticos do composto de Aloe vera e mel no tratamento do carcinosarcoma de Walker 256 em ratos", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes / Rebeka Tomasin, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEE/Unicamp em 29 de novembro de 2007.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1400-1, entitled "Effects of Aloe vera and honey on tumor growth evaluation in rats", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on November 29, 2007.

Campinas, 29 de novembro de 2007.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEE/IB – Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telephone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea>

ANEXO 8: Artigo Submetido à Revista Phytotherapy Research

Phytotherapy Research

**Oral administration of Aloe vera and honey reduces Walker
tumour growth by decreasing cell proliferation and
increasing apoptosis in tumour tissue.**

Journal:	<i>Phytotherapy Research</i>
Manuscript ID:	PTR-10-0302
Wiley - Manuscript type:	Short Communication
Date Submitted by the Author:	17-Mar-2010
Complete List of Authors:	Tomasin, Rebeka; State University of Campinas, Anatomy, Cell Biology and Physiology and Biophysics Gomes-Marcondes, Maria Cristina; State University of Campinas, Anatomy, Cell Biology and Physiology and Biophysics
Keyword:	Aloe vera, honey, Walker 256 tumour, apoptose, cell proliferation



Oral administration of *Aloe vera* and honey reduces Walker tumour growth by decreasing cell proliferation and increasing apoptosis in tumour tissue.

Rebeka Tomasin¹, Maria Cristina Cintra Gomes-Marcondes^{1*}

¹Laboratory of Nutrition and Cancer, Department of Anatomy, Cell Biology and Physiology and Biophysics, Institute of Biology, State University of Campinas - UNICAMP, Campinas, 13083970, São Paulo, Brazil.

SHORT TITLE: *Aloe vera* and honey reduces tumour growth

KEY WORDS: *Aloe vera*, honey, cancer, proliferation, apoptosis.

*Corresponding author: Maria Cristina Cintra Gomes-Marcondes
Telephone number: 55-19-3521-6194
Fax number: 55-19-3521-6185
E-mail address: cintgoma@unicamp.br

ABSTRACT

Cancer is diagnosed in approximately 11 million people and is responsible for almost 8 million deaths worldwide every year. Research in cancer control has shown the importance of co-adjuvant therapies. *Aloe vera* may reduce tumour mass and metastasis rates, while honey may inhibit tumour growth. This study verified the influence of *Aloe vera* and honey on tumour growth and in the apoptosis process by assessing tumour size, the cell proliferation rate (Ki67-LI) and Bax/Bcl-2 expression at 7, 14 and 20 days after Walker 256 carcinoma implant in Wistar rats distributed into two groups: WA group - tumour-bearing rats which received a gavage with a 670 µl/kg dose of *Aloe vera* and honey solution daily, and CW group - tumour-bearing rats which received only a 0.9% NaCl solution. The effect of *Aloe vera* and honey against tumour growth was observed through a decrease in relative weight (%) and Ki67-LI in tumours from WA group compared to those from CW group. The Bax/Bcl-2 ratio increased in tumours from WA group at all tested timepoints. These data suggest *Aloe vera* and honey can modulate tumour growth by reducing cell proliferation and increasing apoptosis susceptibility.

INTRODUCTION

Cancer is diagnosed in approximately 11 million people and is responsible for almost 8 million deaths worldwide every year. Starting from a single cell that is transformed by a multistage process, the genesis of cancer is mainly characterised by the rapid proliferation of abnormal cells, invasion of adjacent tissues and spread to distant organs (metastasis) (World Health Organization, 2009).

Cancer growth could be linked to two major abnormal cell characteristics: unrestrained cell proliferation and insufficient apoptotic turnover (Nicholson, 2000).

The nuclear protein Ki-67 is expressed during the cell cycle in all the proliferation phases (G1, S, G2, and mitosis) but is absent in the resting phase (G0). These expression patterns make Ki-67 an excellent and commonly-used marker to identify the "growth fraction" of a cell population. According to several studies of some types of tumours, the Ki-67 labelling index (Ki67-LI), expressed as the percentage of immuno-reactive tumour cells among the total counted tumour cells, seems to have a prognostic value for survival and tumour recurrence (Scholzen & Gerdes, 2000).

Cell survival is dependent on the complex interplay between pro-apoptotic and anti-apoptotic proteins. Perhaps, the main class of proteins involved in this process is the Bcl-2 family, which includes a large number of proteins. Among them, Bax and Bcl-2 are pro-apoptotic and anti-apoptotic factors, respectively.

Under normal conditions, Bax is localised in the cytoplasm as a soluble monomeric protein, but upon stimulation (e.g., DNA damage), Bax undergoes a conformational change to an activated form and translocates to the mitochondrial membrane. Therefore, this protein associates as homo-oligomers that promote the permeabilisation of the outer mitochondrial membrane. This allows water and small

1
2
3
4
5 molecules to pass through, leading to the swelling of intermembrane space and rupture
6
7 of the outer mitochondrial membrane. Consequently, toxic proteins such as cytochrome
8
9 c are released from the intermembrane space of the mitochondria; this essential
10
11 component of the respiratory chain, when released in the cytoplasm and in the presence
12
13 of ATP, together with Apaf-1 and procaspase 9 forms the “apoptosome”. This
14
15 activates caspase 9 and triggers the classic apoptotic cascade, leading to apoptotic cell
16
17 death (Bröker *et al.*, 2005; Dai & Grant, 2007).
18
19

20
21 In contrast, the anti-apoptotic Bcl-2 protein prevents cell death by hetero-
22
23 dimerising with Bax-like proteins, blocking its function and consequently, the progress
24
25 of the apoptotic cascade (Adams & Cory, 2007).
26
27

28
29 Recent studies have shown that conventional cancer therapies, such as
30
31 chemotherapy, radiotherapy and surgery, could be administered in association with co-
32
33 adjuvant therapies. Together, these can improve the prognosis and the quality of life of
34
35 cancer patients (Montbriand, 2004). Studies suggest that *Aloe vera* (Linne) (Liliaceae)
36
37 has some pharmacological activities, including immunomodulation and anticancer
38
39 properties. The components of *Aloe vera* might inhibit tumour growth, reduce tumour
40
41 mass and inhibit metastasis (Akev *et al.*, 2007; He *et al.*, 2008). Concurrently, honey
42
43 has also been shown to have anticancer properties, including the inhibition of tumour
44
45 cell transformation and proliferation, and induction of apoptosis (Swellam *et al.*, 2003).
46
47 Based on these previous results, the main purpose of this research was to analyse the
48
49 modulating effects of an *Aloe vera* and honey solution on tumour growth, tumour cell
50
51 proliferation and apoptosis induction during cancer development in an *in vivo* model.
52
53
54
55
56
57
58

59 MATERIALS AND METHODS

60

Aloe vera and honey solution:

Mature and healthy leaves of *Aloe vera* (500 g) collected from greenhouse at State University of Campinas/SP Brazil, were homogenised with honey (Lambertucci Ltda, Rio Claro, Brazil) (500 g) and ethylic alcohol (30 mL) in aseptic conditions and kept in dark vials and at a low temperature (4°C) (Zago, 2004).

Experimental protocol:

Adult male Wistar rats (90 days old, body weight approximately 300 g) were implanted subcutaneously with a Walker 256 carcinoma cell suspension (1×10^6 viable tumour cells). Treatment was distributed in two groups of rats: the WA group (n=15), received a gavage with a 670 µl/kg dose of the *Aloe vera* and honey solution daily, while the CW group (n=15) was gavaged with 670 µl/kg of 0.9% NaCl solution.

At timepoints of 7, 14 and 20 days after tumour implantation, five rats from each group (CW and WA) were randomly chosen to be sacrificed, and their tumours were dissected, weighed and aliquoted for further analyses.

The general guidelines of the UKCCCR (United Kingdom Co-ordinating Committee on Cancer Research, 2005) for animal welfare were followed (Vale *et al.*, 2005), and the experimental protocols were approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (CEE.A.IB/UNICAMP, protocol # 1400-1).

Immunohistochemistry:

Once the tumour weights were determined, appropriately-sized samples were fixed in a 4% para-formaldehyde solution for 24 hours and then buried in paraffin blocks following routine procedures. Cross sections (5 µm) taken from these blocks were mounted on poly-L-lysine-coated slides, de-paraffinised, rehydrated through a series of incubations from alcohol to distilled water, treated with 3% hydrogen peroxide

1
2
3
4
5 in PBS for 30 min (to block endogenous peroxidase activity) and microwaved on high
6
7 for 10 min in 0.01 N sodium citrate buffer, pH 6.4. After blocking with horse serum at
8
9 room temperature for 30 min, the primary antibodies specific to Ki-67 (AnaSpec, Inc.,
10
11 San Jose, CA, USA), Bax and Bcl-2 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA,
12
13 USA), were applied at appropriate dilutions for incubation at 4°C in a humidified
14
15 chamber *overnight*. The sections were washed five times for 5 min each in PBS and
16
17 linked with the appropriate host avidin biotinylated horseradish peroxidase-tagged
18
19 secondary antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) for 60
20
21 minutes. We used the ABC kit (Easy Path) to obtain better visualisation. Colour
22
23 development was obtained with 3,3'-diaminobenzidine, and counterstaining was
24
25 performed with Harris hematoxylin. Immunostaining of a tissue section in the absence
26
27 of the primary antibody was used as a negative control. Visualisation and
28
29 documentation were accomplished with a LEICA microscope supporting a video
30
31 camera, and analyses were done on Image Pro-Plus software (1.0 version, Media
32
33 Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

34
35 To determine stained cell percentages, about 300 cells from at least 3 random
36
37 fields (approximately $12 \times 10^3 \mu\text{m}^2$) were counted from each tissue section.

38 39 **Statistical analysis:**

40
41 The results were expressed as the mean \pm SEM. Comparisons between the
42
43 untreated tumour-bearing group (CW) and *Aloe vera*- and honey-treated tumour-bearing
44
45 group (WA) were performed using the unpaired t test. The p values <0.05 were
46
47 considered statistically significant. The statistical analysis was performed using the
48
49 Graph Pad Prism software (v3.00 for Windows 98, USA) (Gad & Weil, 1994).
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

RESULTS

Tumour growth was modulated by the *Aloe vera* and honey solution

The effect of the *Aloe vera* and honey solution on tumour growth was evident in the treated group (WA) compared to the untreated group (CW) (Figure 1A). Upon tumour growth analysis, the tumours in the WA group were smaller in mass (represented by a decrease in relative weight (%)) compared to the tumours in the CW group, and this difference continued to increase at later timepoints, especially on the 20th day after the original tumour implantation (Figure 1A).

To investigate and verify the difference in tumour growth, the cell proliferative rates (Ki-67 labelling index, Ki67-LI) in the CW and WA tumour tissue samples (Figure 1B and C) were obtained by the immunohistochemistry assay for Ki-67. The Ki67-LI in WA tumours was markedly decreased at all timepoints, especially on the 14th and 20th days (Figure 1B).

The *Aloe vera* and honey solution affected the Bax and Bcl-2 expression in tumour cells

In comparing the treated and untreated groups, we found that the proteins related to the apoptotic pathway (Bax and Bcl-2) also exhibited differences in expression.

The percentage of tumour cells expressing the pro-apoptotic protein Bax significantly decreased in the untreated group (CW) on the 20th day after tumour implantation compared to the preceding days (7th and 14th). On the other hand, compared to the control group, there was an increase in the percentage of Bax-positive cells found in the tumours of the *Aloe vera*- and honey-treated group (WA) on the 20th day (Figure 2A and 2D).

1
2
3
4
5 Compared to expression found in the tumours from the untreated group (CW),
6
7 the expression of anti-apoptotic protein Bcl-2 was lower in the tumours from the *Aloe*
8
9 *vera*- and honey-treated group (WA) at all examined timepoints (Figure 2B). This
10
11 difference was larger especially on the 7th and 14th days of tumour development (Figure
12
13 2 E).
14

15
16 Indeed, the Bax/Bcl-2 ratio analysis remarkably showed that in comparison to
17
18 the tumours from the untreated group (CW), tumours from the *Aloe vera*- and honey-
19
20 treated group (WA) tended to show bigger indexes throughout the experimental period
21
22 (Figure 2C).
23
24

25 26 27 28 DISCUSSION

29
30 Natural compounds have been used as therapeutic products by humans for
31
32 hundreds of years. It has been shown that approximately 89% of patients with cancer or
33
34 other chronic diseases use alternative therapies, often herbal or natural products
35
36 (Montbriand, 2004). Studies have suggested the effectiveness and applicability of herbs
37
38 and natural products to prevent or treat diseases such as cancer (Montbriand, 2004;
39
40 Surh, 2003).
41
42

43
44 The present study demonstrated that oral administration of an *Aloe vera* and
45
46 honey solution to tumour-bearing rats could inhibit tumour growth; the decrease in
47
48 tumour mass could be observed by comparing the tumour weights of treated rats (WA)
49
50 and untreated rats (CW) throughout the experiment. There are several lines of evidence
51
52 that *Aloe vera* and their components may reduce tumour size or inhibit tumour growth
53
54 *in vivo* and *in vitro* (Surh, 2003; Acevedo-Duncan, *et al* 2004; Lissoni, *et al* 2009), and
55
56 these effects have also been seen with honey (Swellam, *et al*. 2003). There is a need to
57
58
59
60

investigate and further elucidate the active components within the *Aloe vera* and honey solution so that they may be used as co-adjuvants to combat tumour cells.

The understanding of the action and target mechanisms of natural or naturally-derived compounds as cancer-preventative or cancer-therapeutic agents is essential for their application in modern science. Additionally, they could represent a very simple but promising strategy in the treatment of human cancer, once uncontrolled proliferation and abnormal apoptosis leads to the occurrence and development of neoplastic cells, and some natural products that can promote the apoptosis of cancer cells or decrease their proliferation. Therefore, in the present work, it is worth a mention that some events occurring in the tumours, among them, changes in cell cycle progression and cell death promotion caused by *Aloe vera* and honey (Acevedo-Duncan *et al.*, 2004, Swellan *et al.*, 2003), could lead to the smaller tumour sizes observed.

The concomitant decrease of Ki67-LI observed in the treated tumour-bearing rats (WA), suggested that administration of the *Aloe vera* and honey solution can also lead to lower tumour cell proliferation. A high level of Ki67-LI implies that a tumour has a rapid growth rate and, in some cases, indicates aggressiveness and poor prognosis (Scholzen & Gerdes, 2000; Bush *et al.*, 1991). Therefore, the reduction of Ki67-LI observed in the WA group might indicate that the treatment with *Aloe vera* and honey could modulate tumour growth and progression.

Another mechanism usually involved in tumour control is cell death, especially apoptosis. It has been known that Bax and Bcl-2 regulate apoptosis. Bax has a pro-apoptotic effect which can be blocked by Bcl-2 (Vaux *et al.*, 1988; Oltvai *et al.*, 1993). In consequence, the balance between Bax and Bcl-2 expression in the cell could determinate the apoptosis occurrence.

1
2
3
4
5 The results obtained in the present work showed that compared to the Bax
6 expression examined on the 7th and 14th day after tumour implantation, the Bax
7 expression decreased on the 20th day in the tumours from the CW group. In contrast,
8 Bax expression increased in the tumours from the WA group. These data suggested that
9 without treatment the apoptosis process could be inhibited through tumour
10 development. The treatment with *Aloe vera* and honey could have stimulated the
11 increased expression of the pro-apoptotic factor Bax and increased the possibility of cell
12 death.
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22

23 Bcl-2 is overexpressed in many types of tumours, especially in relapsed or
24 chemoresistant malignancies (Reed *et al.*, 1996; Krajewska *et al.*, 1996; Borner *et al.*,
25 1999; Villar *et al.*, 2001; Tothova *et al.*, 2002), and is as an important target for a
26 selective new cancer therapy (An *et al.*, 2004).
27
28
29
30
31
32

33 Bcl-2 expression was significantly lower in the tumours from the WA group
34 compared to the expression in tumours from the CW group, especially during an early
35 timepoint (7th day after implantation). Although the tumour expression levels of Bcl-2
36 tended to equalise between the WA and CW groups at a later time in tumour
37 development (20th day after implantation), the Bax/Bcl-2 ratio was significantly larger
38 in the tumours from the WA group than in the tumours from the CW group at all tested
39 timepoints. It has been proposed that the Bax/Bcl-2 ratio may manage the sensitivity of
40 cells to apoptotic stimuli (Gazzaniga *et al.*, 1996; Thomas *et al.*, 1996), thus, increasing
41 the apoptosis propensity of tumours in rats receiving the *Aloe vera* and honey treatment.
42 In support of these data, several researchers have shown that *Aloe* or honey components
43 can induce apoptosis through a large number of mechanisms, including Bax/Bcl-2
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

regulation (Lin *et al.*, 2006; Choi *et al.*, 2008). Studies have also shown the importance of the synergistic activity of *Aloe* components (Kametani *et al.*, 2007).

These data suggested that *Aloe vera* and honey can modulate tumour growth by reducing cell proliferation and reducing tumour weight. The Bax/Bcl-2 ratio increased in the tumours from the WA group at all tested timepoints, suggesting an increase in apoptosis susceptibility. Further studies are underway in our laboratory to determine what and how the active components within the *Aloe vera* and honey solution could affect the tumour growth. Certainly, a large number of complex mechanisms may be involved in the tumour growth modulation effects of *Aloe vera* and honey that result in changes in proliferative capacity and apoptosis induction.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are thankful to receive financial support from FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, # 2006/06007-3; # 2006/04645-2) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; #304000/2007-8; # 502915/2007-2). MSc. R Tomasin was supported by a scholarship sponsored by FAPESP, Brazil, Grant Number 2007/05788-4. The authors thank Dr. J Marcondes for computational support and Dr. MAR Mello for text and discussion suggestions. The manuscript was edited for proper English language, by native English speaking editors at American Journal Experts.

REFERENCES

- Acevedo-Duncan M, Russell C, Patel S, Patel R. 2004. Aloe-emodin modulates PKC isozymes, inhibits proliferation, and induces apoptosis in U-373MG glioma cells. *Int. Immunopharmacol.* **4**: 1775-1784.
- Adams JM, Cory S. 2007. Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. *Curr. Opin. Immunol.* **19**: 488-496.

Akev N, Turkay G, Can A, Gurel A, Yildiz F, Yardibi H, Ekiz EE, Uzun H. 2007. Effect of *Aloe vera* leaf pulp extract on Ehrlich ascites tumours in mice. *Eur. J. Cancer Prev.* **16**: 151-157.

An J, Chen Y, Huang Z. 2004. Critical upstream signals of cytochrome C release induced by a novel Bcl-2 inhibitor. *J. Biol. Chem.* **279**: 19133-19140.

Borner MM, Brousset P, Pfanner-Meyer B, Bacchi M, Vonlanthen S, Hotz MA, Altermatt HJ, Schlaifer D, Reed JC, Betticher DC. 1999. Expression of apoptosis regulatory proteins of the Bcl-2 family and p53 in primary resected non-small-cell lung cancer. *Br. J. Cancer* **79**: 952-958.

Bröker LE, Kruyt FAE, Giaccone G. 2005. Cell Death Independent of Caspases: A Review. *Clin. Cancer Res.* **11**: 3155-3162.

Bush C, Price P, Norton J, Parkins CS, Bailey MJ, Boyd J, Jones CR, A'Hern RP, Horwich A. 1991. Proliferation in human bladder carcinoma measured by Ki-67 antibody labelling: its potential clinical importance. *Br. J. Cancer* **64**: 357-360.

Choi EJ, Bae SM, Ahn WS. 2008. Antiproliferative effects of quercetin through cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer MDA-MB-453 cells. *Arch. Pharm. Res.* **31**: 1281-1285.

Dai Y, Grant S. 2007. Targeting Multiple Arms of the Apoptotic Regulatory Machinery. *Cancer Res.* **67**: 2908-2911.

Gad SC, Weil CS. 1994. Statistic for toxicologists. In: Wallace H (editor), Principles and Methods of toxicology. *Raven Press Ltda New York*, 221-274.

Gazzaniga P, Gradilone A, Vercillo R, Gandini O, Silvestri I, Napolitano M, Bonici L, Vincenzoni A, Gallucci M, Frati L, Agliano AM. 1996. Bcl-2/bax mRNA expression ratio as prognostic factor in low grade urinary bladder cancer. *Int. J. Cancer* **69**: 100-104.

He TP, Yan WH, Mo LE, Liang NC. 2008. Inhibitory effect of aloe-emodin on metastasis potential in HO-8910PM cell line. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **10**: 383-390.

Kametani S, Kojima-Yuasa A, Kikuzaki H, Kennedy DO, Honzawa M, Matsui-Yuasa I. 2007. Chemical constituents of cape aloe and their synergistic growth-inhibiting effect on ehrlich ascites tumor cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**: 1220-1229.

Krajewska M, Krajewski S, Epstein JI, Shabaik A, Sauvageot J, Song K, Kitada S, Reed JC. 1996. Immunohistochemical analysis of bcl-2, bax, bcl-X, and mcl-1 expression in prostate cancers. *Am. J. Pathol.* **148**: 1567-1576.

Lin J-G, Chen G-W, Li T-M, Chouh S-T, Tan T-W, Chung J-G. 2006. Aloe-Emodin Induces Apoptosis in T24 Human Bladder Cancer Cells Through the p53 Dependent Apoptotic Pathway. *J. Urol.* **175**: 343-347.

- Lissoni P, Rovelli F, Brivio F, Zago R, Colciago M, Messina G, Mora A, Porro G. 2009. A randomized study of chemotherapy versus biochemotherapy with chemotherapy plus *Aloe arborescens* in patients with metastatic cancer. *In Vivo* **23**: 171-176.
- Montbriand MJ. 2004. Herbs or natural products that decrease cancer growth part one of a four-part series. *Oncol. Nurs. Forum* **31**: E75-E90.
- Nicholson DW. 2000. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. *Nature* **407**: 810-816.
- Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ. 1993. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* **74**: 609-619.
- Reed JC, Miyashita T, Krajewski S, Takayama S, Aime-Sempe C, Kitada S, Sato T, Wang HG, Harigai M, Hanada M, Krajewska M, Kochel K, Millan J, Kobayashi H. 1996. Bcl-2 family proteins and the regulation of programmed cell death in leukemia and lymphoma. *Cancer Treat. Res.* **84**: 31-72.
- Scholzen T, Gerdes J. 2000. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J. Cell Physiol.* **182**: 311-322.
- Surh Y-J. 2003. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat. Rev. Cancer* **3**: 768-780.
- Swellam T, Miyanaga N, Onozawa M, Hattori K, Kawai K, Shimazui T, Akaza H. 2003. Antineoplastic activity of honey in an experimental bladder cancer implantation model: in vivo and in vitro studies. *Int. J. Urol.* **10**: 213-219.
- Thomas A, El Roubi S, Reed JC, Krajewski S, Silber R, Potmesil M, et al. 1996. Drug-induced apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia: relationship between p53 gene mutation and bcl-2/bax proteins in drug resistance. *Oncogene* **12**: 1055-1062.
- Tothova E, Fricova M, Stecova N, Kafkova A, Elbertova A. 2002. High expression of Bcl-2 protein in acute myeloid leukemia cells is associated with poor response to chemotherapy. *Neoplasia* **4**: 141-144.
- Vale C, Stewart L, Tierney J. 2005. UK Coordinating Committee For Cancer Research National Register Of Cancer. Trends in UK cancer trials: results from the UK Coordinating Committee for Cancer Research National Register of Cancer Trials. *Br. J. Cancer* **92**: 811-814.
- Vaux DL, Cory S, Adams JM. 1988. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* **335**: 440-442.
- Villar E, Redondo M, Rodrigo I, Garcia J, Avila E, Matilla A. 2001. Bcl-2 Expression and apoptosis in primary and metastatic breast carcinomas. *Tumour Biol.* **22**: 137-145.
- World Health Organization (WHO). <http://www.who.int/cancer/en/>. Accessed on April, 20th 2009.

Zago R, 2004. Babosa não é remédio. Mas cura! 3ª Edição - Editora Vozes, 128p.

For Peer Review

Figure 1. **Tumour growth evolution was affected by *Aloe vera* and honey solution**

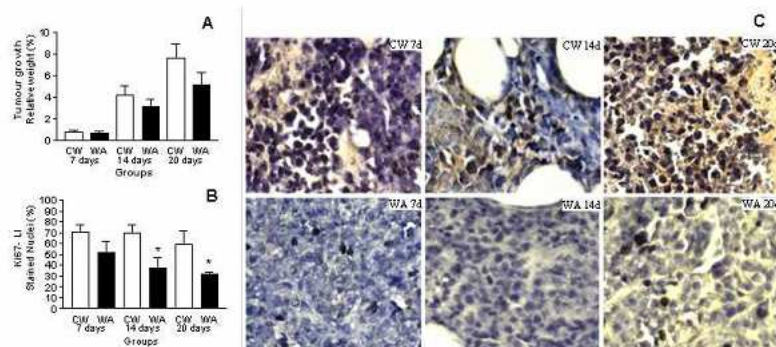
A- Tumour size (% relative weight), B - Ki-67 expression in tumour samples from untreated rats (CW) and *Aloe vera*- and honey-treated rats (WA) at 7, 14 and 20 days after tumour implantation. C - Immunohistochemistry images for Ki-67-stained cells in tumours from CW and WA groups on different days after tumour induction (Magnification=1000x). Legend: CW 7d: The tumour-bearing control group (CW) on the 7th day of tumour development; CW 14d: The CW group on the 14th day of tumour development; CW 20d: The CW groups on the 20th day of tumour development; WA 7d: The *Aloe vera*- and honey-treated tumour-bearing group (WA) on the 7th day of tumour development; WA 14d: The WA group on the 14th day of tumour development; WA 20d: The WA group on the 20th day of tumour development. The results are expressed as the mean \pm SEM. * $P < 0.05$ indicates significant differences within each column between the CW and WA groups on the different tested timepoints.

Figure 2. **The *Aloe vera* and honey solution changed the expression of Bax and Bcl-2 in tumour cells.**

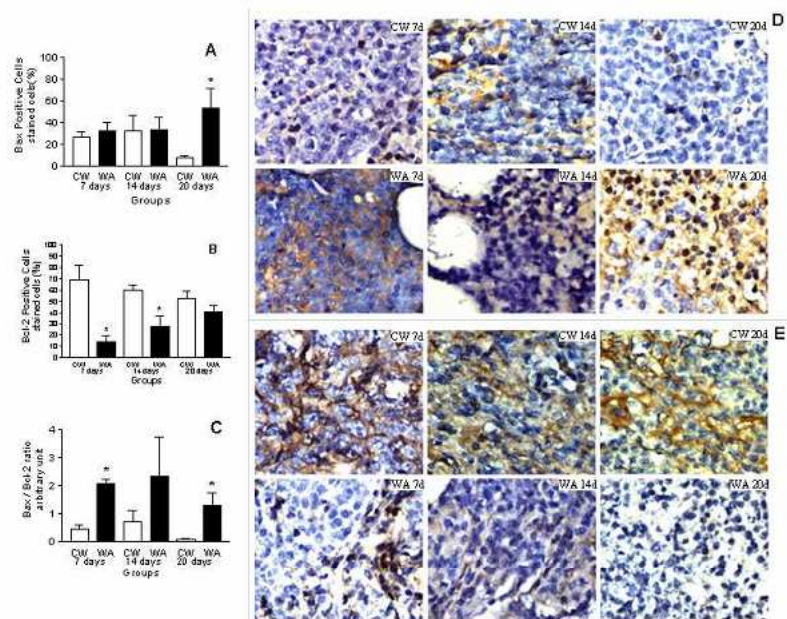
A - % of Bax-positive cell expression, B - % of Bcl-2-positive cell expression, C - the Bax/Bcl-2 ratio (arbitrary unit) in tumour samples from untreated rats (CW) and *Aloe vera*- and honey-treated rats (WA). D - Immunohistochemistry images of cells stained for immunohistochemical detection of Bax protein in CW and WA tumours on different days after tumour induction (Magnification - 1000x). E - Immunohistochemistry detection for Bcl-2 expression in tumours from the CW and WA groups on different days after tumour induction (Magnification - 1000x). Legend: CW 7d: tumour-bearing control group (CW) on the 7th day of tumour development; CW 14d: The CW group on the 14th day of tumour development; CW 20d: The CW group on the

20th day of tumour development; WA 7d: The *Aloe vera*- and honey-treated tumour-bearing (WA) group on the 7th day of tumour development; WA 14d: The WA group on the 14th day of tumour development; WA 20d: The WA group on the 20th day of tumour development. * $P < 0.05$ indicates significant differences within each column between the CW and WA groups among the different tested timepoints.

For Peer Review



200x89mm (96 x 96 DPI)



200x159mm (96 x 96 DPI)