

EFEITO DO EXTRATO ALCOÓLICO DA *ALOE VERA* NA SOBREVIDA DE CAMUNDONGOS E NO CRESCIMENTO DO TUMOR SÓLIDO DE EHRLICH

EFFECT OF ALCOHOLIC EXTRACT OF *ALOE VERA* ON SURVIVAL OF MICE AND TUMOR GROWTH OF SOLID EHRLICH TUMOR

Nara Macedo BOTELHO²; Renata Vidal LEÃO³; Heliana Freitas de Oliveira GÓES³; Luély Ananda dos Santos RIBEIRO³; Nathalia Karla Fonseca FILGUEIRAS³ e Edvaldo Lima SILVEIRA⁴

RESUMO

Objetivo: analisar o efeito do extrato alcoólicoda *Aloe vera* na sobrevida de camundongos e no crescimento do tumor sólido de Ehrlich. **Método:** a amostra contou com 23 animais distribuídos em 04 grupos com 05 animais em cada, sendo estes: Tumor + Água 1 (TA1), no qual os animais receberam água destilada; Tumor + *Aloe vera* 1 (TAV1), no qual os animais receberam extrato alcóolico da *Aloe vera*, para análise da evolução tumoral. Para o estudo da sobrevida os grupos foram: Tumor + Água 2 (TA2) e Tumor + *Aloe Vera* 2 (TAV2). O tumor foi injetado via subcutânea no dorso de todos os animais. A administração das substâncias foi realizada por gavagem. No dia previsto, foi realizada eutanásia dos animais e a dissecação tumoral, sendo as peças tumorais pesadas e realizada análise macroscópica e histopatológica. **Resultados:** no grupo TA1, a média do peso dos tumores ressecados foi 0,182g, detectou-se ascite e aderências em 02 animais e metástases em 04 destes. Já no grupo TAV2, a média do peso tumoral foi 0,258g, detectou-se ascite e aderências em 01 animal e metástases foram verificadas em 04. Nos grupos de análise da sobrevida, todos os animais do grupo TA2 conseguiram sobreviver até o 20º dia pós-implante, o mesmo ocorreu somente com 03 animais do grupo TAV2. **Conclusão:** a utilização do extrato alcoólicoda *Aloe vera* não apresentou efeito benéfico na sobrevida de camundongos e não se mostrou estatisticamente relevante no crescimento do tumor sólido de Ehrlich.

DESCRITORES: *Aloe vera* , câncer, Ehrlich

INTRODUÇÃO

De acordo com estudos desenvolvidos em conjunto com a Organização Mundial da Saúde (OMS) aproximadamente 84 milhões de pessoas correm o risco de morrer de câncer na próxima década. ¹

Da mesma forma, a Agência Internacional de Energia Atômica estima que, nos próximos 10 anos, 70% dos novos casos de câncer no mundo ocorram em países em desenvolvimento. ¹

Assim, para o combate ao câncer se torna cada vez mais importante a testagem das novas substâncias, sendo a forma mais adequada a utilização de tumores experimentais como o tumor de Ehrlich, o qual desponta como uma boa

alternativa à testagem de substâncias no combate ao câncer. ²

A vantagem da utilização de neoplasias transplantáveis, em comparação às demais, recai sobre o conhecimento prévio do número de células tumorais e de suas características iniciais, além de seu rápido desenvolvimento, o que restringe o tempo de estudo. ³

Entre as substâncias usadas em estudos experimentais no combate ao câncer, tem-se a *Aloe vera* (sinônimo de *Aloebarbadensismiller*). Alguns estudos recentes tem demonstrado o efeito inibitório direto do extrato e do gel da *Aloe* sobre a iniciação e promoção tumoral. ⁴

A *Aloe veratem* propriedades antioxidantes, imunomoduladoras⁵, anti-inflamatórias, cicatrizantes⁶, antitumoral⁴, dentre

¹Trabalho realizado no Laboratório de Cirurgia Experimental da Universidade do Estado do Pará (UEPA)

²Professora Doutora da Universidade Federal do Pará e da Universidade do Estado do Pará

³Acadêmicos do Curso de Medicina da Universidade do Federal do Pará e Universidade do Estado do Pará

⁴Professor Mestre da Universidade Federal do Pará

outras. Tais propriedades justificam o seu uso popular.⁷

Neste sentido, um estudo realizado em 2007 avaliou que a *Aloe vera* tem atividade anticancerígena em AGS e NCI-N81 (linhagens celulares de carcinoma gástrico humano) e o mecanismo envolve a indução da apoptose. Dessa forma, a *Aloe vera* mostrou efeito contra o carcinoma gástrico.⁸

Frente a este cenário, observa-se a necessidade da realização de estudos experimentais que avaliem o efeito da *Aloe vera* no crescimento tumoral e na sobrevida de camundongos com tumor sólido de Ehrlich, para assim verificar se haverá diminuição ou até mesmo ausência do crescimento do tumor, bem como aumento na sobrevida com a utilização de um produto de baixo custo e fácil acesso.

MÉTODO

Os animais da presente pesquisa foram cuidados segundo a legislação nacional para vivissecção animal em vigor (Lei federal 6.638 de 08 de maio de 1979) e as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, sendo o projeto de pesquisa submetido a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade do Estado do Pará (UEPA).

O extrato alcoólico de *Aloe vera* utilizado foi produzido em farmácia de manipulação. A amostra foi de 23 camundongos da espécie *Mus musculus*, machos, adultos, provenientes do Biotério do Laboratório de Cirurgia Experimental da Universidade do Estado do Pará.

Inicialmente, três animais foram utilizados para um melhor aperfeiçoamento na técnica de manutenção tumoral, inoculação e gavagem.

Os animais foram distribuídos em 04 grupos com 05 animais em cada, sendo os grupos: Tumor + Água 1 (TA1), no qual os animais receberam água destilada na quantidade equivalente a de extrato alcoólico de *Aloe vera*; Tumor + *Aloe vera* 1 (TAV1), no qual os animais receberam o extrato alcoólico da *Aloe vera* na dose de 1000mg/kg, para análise da evolução tumoral. Para o estudo da sobrevida dos animais foram compostos os grupos Tumor + Água 2 (TA2) e Tumor + *Aloe Vera* 2 (TAV2). Os animais foram pesados diariamente, a fim de se saber a quantidade de extrato a ser administrado.

As substâncias foram administradas aos animais via gavagem, com o auxílio de seringa de 5 ml acoplada a uma sonda uretral nº 6.

Para a obtenção e posterior inoculação do tumor, inicialmente foi feita a eutanásia dos animais portadores realizada a antissepsia da parede abdominal, seguida de paracentese utilizando-se seringa de 5ml e agulha 25x7, a fim de se realizar a retirada de líquido ascítico (LA) contendo as células neoplásicas.

A seguir as células foram coradas com o corante Azul de Tripán e verificada sua concentração e viabilidade, utilizando-se uma câmara de Neubauer acoplada à microscopia óptica. O líquido ascítico foi então diluído em solução salina (NaCl 0,9%) até obter-se concentração de 2×10^7 células/ml.

O inóculo foi injetado, por via subcutânea, no dorso de todos os animais, com um ponto de referência de 3 cm acima da inserção da pata traseira direita. Para tanto, foram utilizadas seringas de 5 ml e agulhas hipodérmicas descartáveis individuais.⁹

O dia da inoculação tumoral foi considerado como D0, sendo iniciada a administração das substâncias aos animais por gavagem a partir de D3, ou seja, três dias após a inoculação do tumor.

Nos grupos destinados para a análise do crescimento tumoral (TA1 e TAV1), a eutanásia dos camundongos foi realizada no 12º dia após a inoculação do tumor, por meio de inalação excessiva de éter etílico.

Nos grupos destinados para a análise da sobrevida (TA2 e TAV2), os camundongos continuaram a receber diariamente as substâncias descritas até o dia de suas mortes.

Após constatação do óbito dos animais, foi realizada cuidadosa dissecação tumoral e as peças foram pesadas. O aspecto das peças foi anotado em protocolos individuais. Verificou-se, ainda, a ocorrência de aderências, presença ou ausência de ascite e metástases.

Após a análise macroscópica, as peças foram dissecadas do subcutâneo e encaminhadas para exame histopatológico, no qual foi utilizada a coloração por hematoxilina e eosina. Os dados coletados foram anotados em protocolos de pesquisa e posteriormente realizou-se a comparação entre os grupos no intuito de avaliar a sobrevida dos camundongos, bem como a evolução do tumor sólido de Ehrlich.

Os dados obtidos no presente estudo foram submetidos à análise estatística através do teste ANOVA e, na presença de diferença

estatisticamente significativa, empregou-se o teste Tukey, adotando-se como nível de significância $p = 0,05$. Para tanto, utilizou-se o software Bioestat® 5.0.

RESULTADOS

No grupo TA1, a média do peso dos tumores ressecados foi 0,182g (Tabela I). Detectou-se ascite e aderências em 02 animais e metástases em 04 destes (Tabela II).

Tabela I–Efeito do extrato alcoólicoda *Aloe vera* no crescimento do tumorsólido de Ehrlich – análise do peso tumoral.

| Peso tumoral * | TA1 | TAV1 |
|----------------|--------|--------|
| Camundongo 1 | 0,176g | 0,180g |
| Camundongo 2 | 0,135g | 0,600g |
| Camundongo 3 | 0,215g | 0,217g |
| Camundongo 4 | 0,100g | 0,006g |
| Camundongo 5 | 0,288g | 2,364g |
| Média | 0,182g | 0,258g |

Fonte: Protocolo de pesquisa.

* $p < 0,05$ (ANOVA um critério complementado com Teste Tukey).

Já no grupo TAV1, a média do peso dos tumores foi de 0,258g (Tabela I). Detectou-se ascite e aderências em apenas 01 animal e metástases foram verificadas em 04 camundongos deste grupo (Tabela II).

Tabela II - Efeito do extrato alcoólicoda *Aloe vera* no crescimento do tumorsólido de Ehrlich - análise macroscópica.

| Grupos* | ascite | aderência | metástases |
|---------|--------|-----------|------------|
| TA1 | 02 | 02 | 04 |
| TAV1 | 01 | 01 | 04 |

Fonte: Protocolo de pesquisa.

* $p < 0,05$ (ANOVA um critério complementado com Teste Tukey).

À microscopia, em todos os animais dos grupos TA1 e TAV1 verificou-se a presença de células pleomórficas e anaplásicas, figuras mitóticas atípicas e áreas de necrose (Tabela III).

Tabela III- Efeito do extrato alcoólicoda *Aloe vera* no crescimento do tumorsólido de Ehrlich – análise microscópica.

| Grupos* | Célula pleomórfica | Célula anaplásica | Figuras mitóticas atípicas |
|---------|--------------------|-------------------|----------------------------|
| TA1 | 05 | 05 | 05 |
| TAV1 | 05 | 05 | 05 |

Fonte: Protocolo de pesquisa.

* $p < 0,05$ (ANOVA um critério complementado com Teste Tukey).

Áreas de hemorragia foram detectadas em 02 animais do grupo TA1, o que não ocorreu em TAV1. As áreas de necrose foram observadas em 05 animais em ambos os grupos analisados (Tabela IV).

Tabela IV - Efeito do extrato alcoólicoda *Aloe vera* no crescimento do tumorsólido de Ehrlich – análise quanto a áreas de necrose e hemorragia.

| Grupos* | Áreas de necrose | Áreas de hemorragia |
|---------|------------------|---------------------|
| TA1 | 05 | 02 |
| TAV1 | 05 | 00 |

Fonte: Protocolo de pesquisa.

* $p < 0,05$ (ANOVA um critério complementado com Teste Tukey).

Na análise da sobrevida, todos os animais do grupo TA2 conseguiram sobreviver até o 20º dia pós-implante, o mesmo ocorreu somente com 03 animais do grupo TAV2 (Tabela V).

Tabela V- Efeito do extrato alcoólicoda *Aloe vera* na sobrevida de camundongos com tumor de Ehrlich.

| Grupos* | Sobrevida em 20 dias (N) | % |
|---------|--------------------------|------|
| TA2 | 5 animais | 100% |
| TAV2 | 3 animais | 60% |

Fonte: Protocolo de pesquisa.

* $p < 0,05$ (ANOVA um critério complementado com Teste Tukey).

No grupo sobrevida, observou-se que no grupo TA2 houve ascite em 01 animal e metástase em 01. Já no grupo TAV2 não houve ascite em nenhum animal e foi encontrada aderência em 01 e metástases em 02 (Tabela VI).

Tabela VI - Efeito do extrato alcoólico da *Aloe vera* na sobrevida em 20 dias de camundongos com tumor de Ehrlich – análise macroscópica.

| Grupos* | ascite | aderência | metástases |
|---------|--------|-----------|------------|
| TA2 | 01 | 00 | 01 |
| TAV2 | 00 | 01 | 02 |

Fonte: Protocolo de pesquisa.

*p < 0,05 (ANOVA um critério complementado com Teste Tukey).

DISCUSSÃO

A *Aloe vera* tem sido constantemente avaliada quanto a sua ação antimutagênica, devido ao grande número de situações em que ela é utilizada popularmente como anticancerígena.¹⁰ Sabe-se, entretanto que muitas de suas aplicações na prática clínica é baseada mais no uso histórico da substância do que em evidências clínicas bem definidas.¹¹

O presente estudo constatou um maior crescimento tumoral nos animais que receberam o extrato alcoólico de *Aloe vera*, os quais apresentaram peso tumoral médio 0,076g maior que o grupo controle (Tabela I). Estudos como o de Tomasin (2011), o qual igualmente avaliou o efeito desta substância em um tumor experimental, mostrou que a *Aloe vera* foi capaz de modular o crescimento tumoral através da redução da proliferação e aumento da susceptibilidade à apoptose. A análise foi realizada através da mensuração do tamanho tumoral e taxa de proliferação celular, além da análise da expressão do Bax/Bcl-2.¹²

Outros estudos mostraram que a *Aloe vera* causou inibição significativa do tumor ascítico de Ehrlich, em comparação com o grupo controle, constatando que este efeito, provavelmente, foi decorrente da modulação dos níveis de enzimas antioxidantes e detoxificantes, as quais são participantes da gênese tumoral.¹³ Também no estudo de Esmatet al. (2006), em cultivo celular de células humanas de câncer de mama, a planta mostrou capacidade de reduzir o número de células mitóticas através do aumento da apoptose.¹⁴

Outra explicação ao efeito antitumoral da *Aloe vera* seria pela sua ação inibitória nas enzimas metaloproteinases, as quais exercem funções na remodelagem fisiológica e patológica na matriz extracelular, estando implicadas na progressão tumoral de muitas malignidades

humanas, interferindo em eventos angiogênicos, invasivos e metastáticos.¹⁵

No estudo de Akevet al. (2007), a *Aloe vera* mostrou efeito de prevenção do desenvolvimento tumoral, além de efeito positivo na regressão do tumor. Estes benefícios foram atestados pela significativa diminuição nos níveis de fator de necrose tumoral- α e ácido siálico no grupo que recebeu a substância via gavagem, em comparação ao grupo controle.¹⁶

Kim et al. (1999), testando o extrato da *Aloe vera* em células de fígado de ratos, também constatou o efeito antígeno-tóxico e antitumorigênico *in vitro* da *Aloe*, referindo-a como um potencial agente de quimioprevenção do câncer.¹⁷

A análise da sobrevida mostrou que todos os animais do grupo TA2 conseguiram sobreviver até o 20º dia pós-implante, o mesmo ocorreu somente com três animais do grupo TAV2. Isto demonstra uma possível toxicidade da porção alcoólica do extrato de *Aloe vera*, visto que na necrópsia dos animais do grupo TAV2 que evoluíram a óbito antes do 20º dia pós-implante, estes se apresentavam ascíticos e gravemente ictericos. Por outro lado, o estudo de Wang et al. (2004) observou um aumento na sobrevida de 10% para 86% em camundongos que receberam a substância.¹⁸

O estudo de Lissoniet al. (2009), que analisou o tratamento de 240 pacientes com tumores sólidos metastáticos, sugeriu que a *Aloe* poderia ser utilizada em associação à quimioterapia, com benefício no aumento de sua eficácia em termos de regressão tumoral e aumento da sobrevida.¹⁹

CONCLUSÃO

A utilização do extrato alcoólico da *Aloe vera* não apresentou efeito benéfico na sobrevida de camundongos e não se mostrou estatisticamente relevante no crescimento do tumor sólido de Ehrlich.

SUMMARY

EFFECT OF ALCOHOLIC EXTRACT OF *ALOE VERA* ON SURVIVAL OF MICE AND TUMOR GROWTH OF SOLID EHRlich TUMOR

Nara Macedo BOTELHO; Renata Vidal LEÃO; Heliana Freitas de Oliveira GÓES; Luély Ananda dos Santos RIBEIRO; Nathalia Karla Fonseca FILGUEIRAS e Edvaldo Lima SILVEIRA

Objective: to analyze the effect of alcoholic extract of *Aloe vera* on the survival of mice and growth of Ehrlich solid tumor. **Methods:** the sample consisted of 23 animals distributed in 04 groups with 05 animals each, the groups were: Tumor + Water (TA1), in which the animals received distilled water; Tumor + *Aloe vera* 1 (TAV1), in which the animals received alcoholic extract of *Aloe vera* for analysis of tumor evolution. To study the survival rate the groups were: Tumor + Water 2 (TA2) and Tumor + *Aloe Vera* 2 (TAV2). The tumor was injected subcutaneously on the back of all animals. The administration of the substances was performed by gavage. Euthanasia and tumoral dissection were performed in the predicted day, and the tumor pieces were weighed and a macroscopic and histopathological analysis was performed. **Results:** in TA1 group, the average weight of resected tumors was 0.182 g, and ascites and adhesions were detected in 02 animals and metastases in 04. In the group TAV2, the average tumor weight was 0.258 g, ascites and adhesions were detected in 01 animal and metastases in 04. In the groups of survival analysis, all animals in group TA2 survived until the 20th day post-implant, the same occurred with only 03 animals in the group TAV2. **Conclusion:** the use of alcoholic extract of *Aloe vera* showed no beneficial effect on survival of mice and was not statistically significant in the growth of Ehrlich solid tumor.

KEY WORDS: *Aloe vera*, cancer, Ehrlich.

REFERÊNCIAS

1. Rádio das nações unidas. Câncer deve subir nos países em desenvolvimento. ONU, 2008. Disponível em: <<http://www.un.org/av/radio/portuguese/detail/5130.html>>. Acessado em: 06 de julho de 2012.
2. Oliveira, PFM; Henriques, LA; Rodrigues-Filho, F; Almeida, PRC; Moraes MO. Estabelecimento de um modelo de tumor experimental pela inoculação do tumor de Walker em estômago de rato. Acta Cir. Bras. 1998; 13(4): 243-8
3. 3-Silva, AE; Santos, FGA; Cassali, GD. Marcadores de proliferação celular na avaliação do crescimento do tumor sólido e ascítico de Ehrlich. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 2006; 58(4)
4. Chaudhary, G; Saini, MR; Goyal, PK. Chemopreventive Potential of *Aloe vera* Against 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene- Induced Skin Papillomagenesis in Mice. Integr. Cancer Ther. 2007; 6(4):405-12
5. Zhang, XF; Wang, HM; Song, YL; Nie, LH; Wang, LF; Liu B e col. Isolation, structure elucidation, antioxidative and immunomodulatory properties of two novel dihydrocoumarins from *Aloe vera*. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2006; 16(4): 949 – 53
6. Sarabia, JEL; Clares, VPR; Clares, RAR; Hernández, VP. Actividad antiinflamatoria y cicatrizante del ungüento rectal de *Aloe vera* L. (sábila). Rev. Cubana Plant. Med. 1999; 3(3): 106 – 9
7. Moraes, SM; Dantas, JP; Silva, ARA; Magalhães, EF. Plantas medicinais usadas pelos índios Tapebas do Ceará. Rev. Bras. Farmacogn. 2005; 15(2): 169-77
8. Chen, SH; Lin, KY; Chang CC; Fang, CL; Lin, CP. *Aloe-emodin*-induced apoptosis in human gastric carcinoma cells. Food Chem. Toxicol. 2007; 45(11): 2296-303
9. Pereira, OCM; Guastale, HA; MVH, Moutinho, VCJ; Almeida, LC. A sobrevivência de ratos com tumor de Walker submetidos previamente à imunogenicidade das células tumorais. Rev. ciênc. bioméd. (São Paulo) 1992; 13: 63-8
10. Sturbelle, RT; Pinho, DS; Restani, RG; Oliveira, GR; Garcias, GL; Martino-Roth, MG. Avaliação da atividade mutagênica e antimutagênica da *Aloe vera* em teste de *Allium cepa* e teste de micronúcleo em linfócitos humanos binucleados. Rev. bras. farmacogn. 2010; 20(3): 409-415. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2010000300019&lng=en. Acessado em: 20 julho 2012
11. Vogler e Ernst, NK. *Aloe vera*: a systematic review of its clinical effectiveness. British Journal of General

- Practice, 1999, 49:823-828
12. Tomasin, R; Cintra, GM. Oral administration of *Aloe vera* and honey reduces walker tumour growth by decreasing cell proliferation and increasing apoptosis in tumour tissue. *Phytother.Res.*, 2011 25: 619–623. doi: 10.1002/ptr.3293
 13. El-Shemy, HA; Aboul-Soud, MAM; Nassr-Allah, AA; Aboul-Enein, KM; Kabash, A; Yagi, A. Antitumor Properties and Modulation of Antioxidant Enzymes' Activity by Aloe vera Leaf Active Principles Isolated via Supercritical Carbon Dioxide Extraction. *Current Medicinal Chemistry*. 2010. Volume 17, Number 2, pp. 129-138
 14. Esmat, AY; Tomasseto, C; Rio, MC. Cytotoxicity of a natural anthraquinone (Aloin) against human breast cancer cell lines with and without ErbB-2: topoisomerase IIalpha amplification. *Cancer Biol Ther* 2006. 5: 97-103
 15. Ribeiro, RIM; Kuribayashi, JS; Borges-Júnior, PC; Beletti, ME; Espíndola, FS; Cassali, GD; Loyola, AM. Inibição de metaloproteinases por extratos aquosos de Aloe Vera, Annona Muricata e chá preto. *Bioscience Journal*. 2010; v. 26, n. 1
 16. Akev, N; Turkay, G; Can, A; Gurel, A; Yildiz, F; Yardibi, H; Ekiz, EE; Uzun, H. Tumour preventive effect of *Aloe vera* leaf pulp lectin (Aloctin I) on Ehrlich ascites tumours in mice. *Phytother.Res.*, 2007. 21: 1070–1075. doi: 10.1002/ptr.2215
 17. Kim, Hs; Kacew, S; Lee Bm. *In vitro* chemopreventive effects of plant polysaccharides (*Aloe barbadensis* Miller, *Lentinusedodes*, *Ganoderma lucidum* and *Coriolus versicolor*). *Carcinogenesis* 1999.20: 1637-1640
 18. Wang, ZW; Zhou, JM; Huang, ZS; Iang, AP; Liu, ZC; Xian, YF; Zeng, YZ; Zhu, XF. *Aloe polysaccharides* mediated radioprotective effect through the inhibition of apoptosis. *Radiat Res* 2004 45: 447-454
 19. 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* 2009. vol. 23: no. 1 171-175

Endereço para correspondência

Luély Ananda dos Santos Ribeiro
Av. Magalhães Barata, 231.
CEP 66040-170.
Telefone: (91) 81534111
luelyribeiro@gmail.com

Recebido em 28.08.2012 – Aprovado em 06.09.2012