

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA

LABORATÓRIO DE RADIOBIOLOGIA E MUTAGÊNESE

**Avaliação das atividades genotóxica, antígenotóxica,
angiogênica e potencial de cicatrização do látex da
Synadenium umbellatum Pax.**

PAULO ROBERTO DE MELO REIS

GOIÂNIA-GOIÁS

NOVEMBRO/2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA

LABORATÓRIO DE RADIOBIOLOGIA E MUTAGÊNESE

Avaliação das atividades genotóxica, antigenotóxica, angiogênica e potencial de cicatrização do látex da *Synadenium umbellatum* Pax.

PAULO ROBERTO DE MELO REIS

ORIENTADORA: Profa. Dra. LEE CHEN CHEN

Tese de doutoramento apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia, área de concentração Biologia Celular e Molecular.

GOIÂNIA-GOIÁS

NOVEMBRO/2009

DEDICATÓRIA

Aos meus Pais,

Austregésilo Reis e Ana de Araújo Melo Reis (*in memoriam*)

Aos meus irmãos

Hamilton, Zilanita, Gelmires e Dimas

A minha esposa Fátima

Pela cumplicidade, pela confiança, pela dedicação, pelo incentivo, pelo apoio constante e pelo amor,

Aos meus filhos,

Paulo Roberto Filho e Filipe Paulo

Essências inequívocas da manifestação e da perpetuação do amor.

A cientista e minha orientadora Dra. Lee Chen Chen

Pela sabedoria, paciência, benevolência e empolgação que nortearam o desenvolvimento deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A minha Orientadora Profa. Dra. Lee Chen Chen, pela orientação, amizade, dedicação, otimismo e espírito científico.

Ao colega, amigo e mestre de sempre, Prof. Dr. Luis Murilo Martins de Araújo, meu respeito, admiração e gratidão.

Aos colegas, Psic. Cláudio Braz da Silva, Ms. Mauro Meira de Mesquita, Ms. Laryssa Silva de Andrade Bezerra, Prof. Manoel dos Santos Pereira, Profa. Ms. Ivanise Correa da Silva Mota e Maria Pessoa (Rosa) pelo trabalho em equipe, pela dedicação, pela amizade e pelo envolvimento neste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Alexandre Felizola Diniz Filho pela amizade, pela colaboração e pela oportunidade de continuidade de nossos estudos.

Aos Profs. Dr. Flávio Monteiro Ayres, Dr. José Realino de Paula e Dra. Kenya Silva Cunha, membros da banca de qualificação, pelas valiosas sugestões.

Minha admiração, gratidão e respeito pelos cientistas, Prof. Dr. Paulo Cesar Naoum e Prof. Dr. Joaquim Coutinho Netto

Ao Coordenador do Doutorado em Biologia, Prof. Dr. Cirano José Ulhoa, pela oportunidade para o .

Ao Coordenador do Mestrado de Ciências Ambientais e Saúde, Prof. Dr. Nelson Jorge da Silva Júnior.

Ao Departamento de Biomedicina da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, na pessoa do Prof. Wilson de Melo Cruvinel

Aos colegas professores e funcionários do Departamento de Biomedicina e do Laboratório da Área de Saúde (LAS-CBB).

Ao escritor Bariani Ortencio, Prof. Dr. José Ângelo Rizzo e pela atenção, informações e conhecimentos compartilhados sobre a planta *Synadenium umbellum*.

A todos os alunos que participaram desse trabalho, tanto pelo envolvimento direto quanto indireto.

E, a Deus, pela inspiração e pela vontade para conseguir realizar esse trabalho.

“Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos, se não tiver caridade, sou como o bronze que soa, ou como o címbalo que retine.

Mesmo que eu tivesse o dom da profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência; mesmo que tivesse toda a fé, a ponto de transportar montanhas, se não tiver caridade, não sou nada”

I Coríntios 13, 1-2.

SUMÁRIO

ABREVIATURAS	XII
LISTA DE FIGURAS	XIV
RESUMO	XV
ABSTRACT	XVII

1 – INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1 - Plantas Medicinais	1
1.2 - <i>Synadenium umbellatum</i> Pax (1894)	4
1.3 - Avaliação da Atividade genotóxica e antigenotóxica	7
1.4 - Testes utilizados para detecção da atividade genotóxica	10
1.4.1 – Teste de Mutagenicidade de Ames	11
1.4.2 – Teste do Cometa	12
1.4.3 – Teste Microsatélite	15
1.4.4 – Teste do Micronúcleo em medula óssea de roedores <i>in vivo</i>	16
1.5 – Atividade angiogênica	21
1.6 – Processo cicatricial	28
2 – OBJETIVOS	34
2.1 - Objetivos gerais	34
2.2 - Objetivos específicos	34
3 – MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 - Teste do micronúcleo em MOH do camundongo	35
3.1.1 – Látex da <i>S. umbellatum</i>	35
3.1.2 – Animais	36

3.1.3 – Reagentes e Soluções	36
3.1.3.1 – Solubilização das células	36
3.1.3.2 – Fixador	36
3.1.3.3 – Tampão Fosfato (pH 6,0)	37
3.1.3.4 – Corante	38
3.1.4 – Controles	38
3.1.4.1 – Controle positivo	38
3.1.4.2 – Controle negativo	38
3.1.5 – Aprovação em comitê de ética	39
3.1.6 - Procedimento Experimental	39
3.1.6.1 – Teste do Micronúcleo em medula óssea de camundongo	39
3.1.6.2 – Análise Citogenética	40
3.1.6.3 – Análise estatística	41
3.2 – Avaliação da atividade angiogênica na CAM	41
3.2.1 – Látex da <i>S. umbellatum</i>	41
3.2.2 – Ovos embrionados de galinha	42
3.2.3 – Drogas e reagentes	42
3.2.4 – Procedimento experimental	43
3.2.5 – Obtenção da imagem e mensuração automatizada da angiogênese	44
3.2.6 – Análise histológica da MCA	45
3.2.7 - Análise Estatística	46
3.3 – Avaliação da cicatrização induzida pelo látex da <i>Synadenium umbellatum</i> Pax (1894) em ferida limpa no dorso de rato	46

3.3.1 – Látex da <i>S. umbellatum</i>	46
3.3.2 – Drogas e reagentes	47
3.3.3 – Procedimento experimentais	47
3.3.3.1. – Anestesia, tricotomia e excisão da pele	47
3.3.4 – Grupos experimentais e tratamento tópico	48
3.3.5 – Avaliação da evolução da cicatrização	49
3.3.6 – Análise estatística	49
4 – REFERÊNCIAS	50

CAPÍTULO 1

1 - Assessment of the mutagenic and antimutagenic activity of <i>Synadenium umbellatum</i> Pax latex by micronucleus test in mice	68
Abstract	69
1 – Introduction	69
2 – Material and Methods	71
2.1 – <i>Synadenium umbellatum</i> latex	71
2.2 – Animals	72
2.3 – Chemicals and drugs	73
2.4 – Experimental design	73
2.5 – Statistical analysis	74
3 – RESULTS	75
4 – DISCUSSION	76
5 – ACKNOWLEDGEMENTS	78
6 - REFERENCES	79
Table 1 - Frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes	84

CAPÍTULO 2

2 - Angiogenic activity of <i>Synadenium umbellatum</i> PAX latex	85
Abstract	857
Resumo	87
1 – Introduction	88
2 – Material and Methods	89
2.1 – <i>Synadenium umbellatum</i> latex	89
2.2 – Fertilized chicken eggs	90
2.3 – Drugs and reagents	90
2.4 – Experimental design	90
2.5 – Obtaining images and automated measure of the angiogenesis	91
2.6 – Histological analysis	91
2.7 – Statistical analysis	92
3 – RESULTS	92
4 –DISCUSSION	93
5 – CONCLUSION	96
6 – ACKNOWLEDGEMENTS	96
REFERENCES	96
Table 1 - Vascularization percentage	100
Figure 1 - Chorioallantoic membrane	100
Figure 2- – Formation of the vascular network	101
Figure 3 - Paraffin sections stained with hematoxylin-eosin	101
Figure 4- Treatment using <i>S.umbellatum</i> latex (Detail of fig. 3H)	102

CAPÍTULO 3

3 - Wound-healing activity of <i>Synadenium umbellatum</i> latex has in rats	103
Abstratc	104
Resumo	104
1 – Introduction	105
2 – Material and methods	106
2.1 – Plant material	107
2.2 – Animals	107
2.3 – Experimental procedure	107
2.4 – Data analysis	108
3 – RESULTS	109
4 – DISCUSSION	111
5 – CONCLUSION	111
6 – ACKNOWLEDGEMENTS	111
7 – REFERENCES	111
Table 1 - Effect of <i>Synadenium umbellatum</i> latex topically in excision wound healing model	115
Figure 1 - Experimental wound area on day 21	116
5 – CONCLUSÕES	117
6 – ANEXOS	118

ABREVIATURAS

CAM – Membrana cório-alantóidea

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EAO – Espécie ativas de oxigênio

EGF – Fator de crescimento epidérmico

ENC – Eritrócitos normocromáticos

EPC – Eritrócitos policromáticos

EPCMN – Eritrócitos policromáticos micronucleados

FGF – Fator de crescimento de fibroblastos

FGFR – Receptor de FGF

HE – Hematoxilina-eosina

i.p. – Intraperitoneal

M - MOLAR

MMC – Mitomicina C

MNPCE - micronucleated polychromatic erythrocytes

MN – Micronúcleo

min – Minutos

mL – Mililitros

MOH – Medula óssea hematopoética

NaCl – Cloreto de sódio

NaOH – Hidróxido de sódio

nm – nanometros

°C – Graus centígrados

PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas

PLGF – Fator de crescimento placentário

PUC Go – Pontifícia Universidade Católica de Goiás

RNA – Ácido ribonucleico

rpm – Rotações por minuto

seg. – Segundos

SuL - *Synadenium umbellatum* látex

TGF- α - Fator de crescimento transformante α

TGF- β - Fator de crescimento transformante β

TGF- β R – Receptor de TGF- β

UFG – Universidade Federal de Goiás

V – Volts

VEGF – Fator de crescimento do endotélio vascular

VEGFR – Receptor de VEGF

VPF – Fator de permeabilidade vascular

μ g – Microgramas

μ g/mL – Microgramas/Mililitros

μ g/ μ L – Microgramas/microlitros

μ L - Microlitros

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – <i>Synadenium umbellatum</i> Pax (1894)	5
FIGURA 2 – Células analisadas pelo teste do cometa	13
FIGURA 3 – Quantificação do grau de lesão do DNA detectado pelo teste do cometa	14
FIGURA 4 – Observação de eritrócitos com policromáticos micronucleados	17
FIGURA 5 – Formação da célula micronucleada	18
FIGURA 6 – Processo de diferenciação dos eritrócitos	19
FIGURA 7 - Esquema representativo do processo angiogênico	22
FIGURA 8 – Esquema das membranas do ovo embrionado de galinha	25
FIGURA 9 – Fotografia digital apresentando a rede vascular na CAM	26
FIGURA 10 – Abertura na casca do ovo para aplicação das substâncias teste...	42

Capítulo 2 - Angiogenic activity of *Synadenium umbellatum*

FIGURE 1 - Chorioallantoic membrane from a fertilized chicken egg	98
FIGURE 2 - Formation of the vascular network in different controls and in the treatment using <i>S. Umbellatum</i> latex	99
FIGURE 3 -Paraffin sections stained with hematoxylin	99
FIGURE 4 -Treatment using <i>S. umbellatum</i> latex	100

Capítulo 3 - Latex of *Synadenium umbellatum* Pax has wound-healing activity in rats dorsal dermal skin.

FIGURE 1 – Experimental wound area on day 21	115
--	-----

RESUMO

A espécie vegetal *Synadenium umbellatum* Pax (1894), conhecida vulgarmente por cola-nota, pertencente à família das *Euphorbiaceae* e apresenta uma seiva leitosa conhecida por látex. Na medicina popular o látex extraído do gênero *Synadenium* apresenta substâncias tóxicas e enzimas proteolíticas. Devido ao uso popular do látex dessa planta como antiinflamatório, cicatrizante, antineoplásico e outros, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade genotóxica, antigenotóxica, citotóxica, angiogênica e o potencial de indução de cicatrização do látex da *Synadenium umbellatum* (SuL). Na avaliação da atividade genotóxica e antigenotóxica utilizou-se o Teste do Micronúcleo em medula óssea de camundongos. Um agente alquilante, mitomicina C, foi utilizado como controle positivo. Na avaliação da atividade angiogênica, o ensaio utilizado foi a membrana corio-alantóidea do ovo embrionado de galinha e no estudo da cicatrização em feridas limpas em dorso de rato foi medida a velocidade de cicatrização da ferida do grupo tratado com SuL e dos grupos controles. Para o teste do micronúcleo, os animais foram tratados com diferentes doses (10, 30, 50, e 100 mg.kg⁻¹) do SuL, via intraperitoneal. Para o teste de antimutagenicidade, os animais foram tratados com as mesmas doses utilizadas na avaliação da mutagenicidade juntamente com uma dose única de Mitomicina C (4 mg.Kg⁻¹). Para o teste da angiogênese utilizou-se a membrana corio-alantóide do ovo embrionado de galinha e as concentrações utilizadas do látex foram de 10 e 20 mg/mL. Para o estudo da cicatrização foi utilizada a técnica de feridas limpas em dorso de ratos que foram submetidos a uma lesão padronizada na pele de 3 x 2,5 cm e posteriormente tratados com 5 mL do SuL, na concentração de 10 mg/mL, como controle positivo utilizou-se a biomembrana de látex da *Hevea brasiliensis* e controle negativo, a salina 0,9%.

Foram avaliadas a velocidade de cicatrização do SuL e controles negativo e positivo. Os resultados mostraram que o látex da *S. umbellatum* foi altamente mutagênico, citotóxico, e antimutagênico e uma ação moderada de anticitotoxicidade. Na avaliação da atividade angiogênica, o látex promoveu um aumento na proliferação de vasos sanguíneos na membrana corio-alantóidea do ovo embrionado de galinha e também induziu um aumento na velocidade de cicatrização nas feridas limpa na pele do dorso de ratos.

ABSTRACT

Synadenium umbellatum Pax (1894) is a vegetable species from *Euphorbiaceae*'s family. The species of this family produce latex. The latex extracted from *S. umbellatum* has been used by the Brazilian people as anti-tumoral, anti-inflammatory and wound healing agents. However, this latex presents toxic substances and proteolic enzymes. The aim of this work was to evaluate the possible genotoxic, antigenotoxic, cytotoxic, angiogenic and wound healing activities of *S. umbellatum* latex (SuL) in rats. The genotoxic and antigenotoxic activities were evaluated by mouse bone marrow micronucleus test. An alkylant agent mitomycin C (4 mg.kg⁻¹ body weight) was used as a positive control. For all doses, micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) frequency was evaluated after 24 hours of treatment. To evaluate the antimutagenic activity, animals were treated with 10, 30, 50 and 100 mg.kg⁻¹ and 4 mg. kg⁻¹ of mitomycin C (MMC) simultaneously. The frequency of MNPCE was evaluated 24 hours after exposure. Cytotoxicity was evaluated by the polychromatic and normochromatic erythrocytes ratio (PCE/NCE). Angiogenic activity of the SuL was evaluated in chorioallantoic membrane (CAM) of fertilized chicken eggs. The concentrations of the SuL were of 10 and 20 mg/mL. Wound healing activity was evaluated in skin of rats. The skin fragment was removed with area 3 x 2,5 cm and submitted to topic application with 5 mL of SuL (concentration 10 mg/mL) and positive and negative controls. The results showed that the SuL was strongly mutagenic, cytotoxic, and antimutagenic, and a moderate activity of anticytotoxicity. In the evaluation of the angiogenesis, the SuL has promoted the increase of the proliferation of blood vessels in the chorioallantoic

membrane of fertilized chicken eggs and it also induced the increase of velocity of wound healing in rat skin lesion.

1 – INTRODUÇÃO GERAL

1.1 – Plantas Medicinais

A utilização de plantas medicinais e das substâncias delas extraídas é tão antiga quanto à própria história do homem (Ortencio, 1997). Os povos primitivos propiciaram a identificação de espécies e de gêneros vegetais bem como das partes dos vegetais que se adequavam ao uso medicinal, favorecendo a prevenção, o tratamento e a cura de distúrbios e disfunções do organismo humano (Farnsworth *et al.*, 1985).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (2004), aproximadamente 80% da população mundial utilizam medicamentos à base de produtos naturais como recursos terapêuticos. Nos países desenvolvidos, os medicamentos derivados das plantas vêm apresentando consumo crescente (Chen *et al.*, 2003; Mitscher *et al.*, 1987). Isso também se verifica nos países em desenvolvimento, mas a justificativa para a utilização dos fitoterápicos faz relação com às condições socioeconômicas da população, ao baixo poder aquisitivo associado também às facilidades de obtenção e as tradições do uso das plantas medicinais. De fato, já se conhece na literatura que muitos princípios ativos dos medicamentos industrializados e utilizados no tratamento de várias doenças foram extraídos dos vegetais (Veiga-Junior, 2008).

O primeiro fármaco obtido dos vegetais foi a morfina da *Papaver somniferum*, em 1803. A partir de então, outras substâncias foram isoladas, como a quinina e a quinidina obtidas da *Cinchona* spp, em 1819 e a atropina,

da *Atropa belladonna*, em 1831, as quais passaram a ser utilizadas em substituição aos extratos vegetais (Turolla & Nascimento, 2006).

Na década de 60, a produção sintética de fármacos foi aumentando e novos medicamentos lançados no mercado consumidor para o tratamento de várias enfermidades. A síntese do ácido acetilsalicílico provocou nos pesquisadores a idéia de que seria possível produzir sinteticamente inúmeros princípios ativos (Schenckel, Gosman & Petrovick, 2004). Entretanto, a idéia da síntese de novos fármacos foi gradativamente diminuindo, primeiramente pela dificuldade química para obter princípios ativos e posteriormente o alto custo da purificação química dos novos fármacos. Nos meados dos anos 1980, o interesse por vegetais, como fonte primária de novos medicamentos, foi intensificado. Os avanços dos conhecimentos científicos sobre as plantas de uso medicinal associados à informática permitiram o desenvolvimento de metodologias com a finalidade de isolar substâncias ativas a partir de recursos naturais (Rates, 2001).

Atualmente, estudos farmacológicos têm gerado conhecimentos sobre o uso das plantas medicinais, as quais representam uma forma alternativa para o tratamento de doenças em várias partes do mundo e tem despertado interesse de pesquisadores no sentido de se obter dos vegetais novos fármacos. (Albuquerque & Hanazaki, 2006; Schenckel, Gosman & Petrovick, 2004).

No Brasil, a imensa biodiversidade propicia uma procura cada vez maior de fitoterápicos. Entretanto, as plantas medicinais não são tão “inócuas” como parecem, pois durante o processo evolutivo, as plantas desenvolveram mecanismos naturais de defesa, como a síntese de substâncias químicas tóxicas e genotóxicas contra ataques de bactérias, fungos, insetos e animais predadores (Castro *et al.*, 2004). Muitas dessas substâncias químicas já foram identificadas como mutagênicos e carcinogênicos, entre as quais podem ser citados flavonóides, hidrazinas, furocumarinas, quinonas, alcalóides de pirrolozidina e teobrominas (Khan *et al.*, 2005; Pereira, 1992), e as que apresentam atividades tóxicas como a estricnina, digoxina, curares, cianogênicos entre outras (Lapa *et al.*, 2004).

Os produtos utilizados na alimentação humana provenientes de vegetais podem também apresentar o papel de agentes causais ou potencializadores no aumento da incidência do câncer, mas em alguns podem agir como anticarcinogênicos (Borek, 1991). Muitos compostos mutagênicos e carcinogênicos podem estar relacionados à formação de espécies ativas de oxigênio (EAO); estas EAO apresentam o papel fundamental em processos degenerativos, lesões do DNA, mutações relacionadas ou não ao câncer, problemas cardíacos e envelhecimento (Khan *et al.*, 2005; Anderson *et al.*, 1995).

Por outro lado, existem em plantas, substâncias que apresentam propriedades antimutagênicas como os beta carotenos (Vitamina A), ácido ascórbico (Vitamina C), o tocoferol (Vitamina E), polifenóis, compostos

sulfídricos, cálcio, fibras, dentre outras (Hiramatsu *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2003; Karakaya & Kavas, 1999). Estudos recentes têm enfatizado as propriedades provenientes das plantas que apresentam substâncias angiogênicas, ou seja, a produção de vasos sanguíneos, a partir de brotos endoteliais pré-existentes e antiangiogênica, isto é, a inibição de formação de novos vasos (Folkman, 2004; Jones *et al.*, 2004).

De fato, nas famílias das *Euphorbiaceae* são conhecidas por sua diversidade de propriedades químicas que vão desde substâncias tóxicas, angiogênicas, antiangiogênicas e outras (Salatino *et al.*, 2007). Particularmente, o látex da espécie vegetal *Synadenium umbellatum* é utilizada pela população de forma variada para o tratamento de inúmeras doenças (Ortencio, 1997).

1.2 – *Synadenium umbellatum* Pax (1894)

Synadenium umbellatum, popularmente designada como “Cola-nota” (Ortencio, 1997), é uma espécie vegetal pertencente à família das *Euphorbiaceae*. Segundo Grosso (2004), a família *Euphorbiaceae* é constituída por 300 gêneros e cerca de 8000 espécies. Apresenta como característica comum uma seiva leitosa, conhecida por látex, presente no caule, galho ou folha (Figura 1).

Na medicina popular o látex extraído de qualquer parte das plantas do gênero *Synadenium* é considerado tóxico. Estudos fitoquímicos realizados

com a família da *Euphorbiaceae* revelaram a presença de flavonoides, saponinas, diterpenes, e esters de phorbol (Bagalkotkar *et al.*, 2006; Jassbi, 2006). Os estudos realizados com a espécie *Synadenium grantii* Hook (African milkbush) por Govindappa *et al.* (1987), Jäger *et al.* (1996), Kinghorn (1980) e Rajesh *et al.* (2006) mostraram que esta espécie apresenta substâncias tóxicas bem como enzimas proteolíticas.

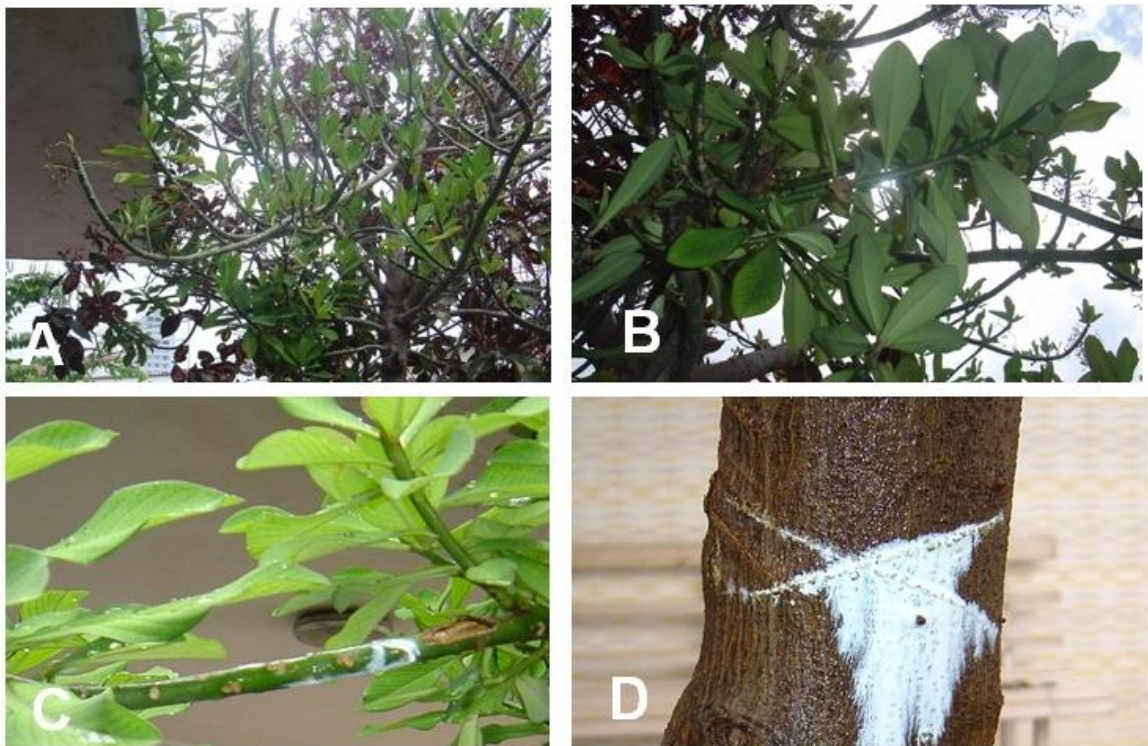


Figura 1 – *Synadenium umbellatum* Pax (1894). A) – visão dos galhos da árvore. B) – Detalhes das folhas. C) – Detalhes das folhas e galhos. Galho mostrando látex. D) – Corte em “x” no tronco da árvore que exhibe grande quantidade de látex. Fotografia obtida com câmera digital Sony Cyber-Shot – 6.0 mega pixels.

Já se têm estudos com outras espécies do gênero quanto à atividade antiinflamatória (Jäger *et al.*, 1996). Para outros gêneros da família das *Euphorbiaceae* existem relatos da atividade antitumoral (Abo, 1988; Hubert *et al.*, 1982; Schroder *et al.*, 1980; Kupchan *et al.*, 1976).

Popularmente, o látex da *Synadenium umbellatum* é indicado tanto na prevenção quanto na terapia de combate a neoplasias malignas (leucemia, câncer de pele, câncer de aparelho digestivo). Também é utilizado como antiinflamatório, cicatrizante, no tratamento de diabetes e outros. O látex apresenta variado modo de uso, por exemplo, 1 gota diária em meio copo de leite de vaca. Outro, dilui-se 18 gotas do látex em um litro de água filtrada ou fervida. Essa solução é armazenada em geladeira e ingerida três vezes por dia. Outro, utiliza-se três gotas do látex da cola-nota no miolo do pão juntamente com um copo de leite de vaca (Nogueira *et al.*, 2008; Ortencio, 1997).

Devido à larga utilização dessa planta pela população e também a presença das atividades farmacológicas e biológicas descritas na literatura da família das *Euphorbiaceae*, no presente trabalho, avaliou-se a atividade mutagênica, antimutagênica e citotóxica do látex da *Synadenium umbellatum* (SuL) pelo teste do micronúcleo na medula óssea hematopoiética de camundongos, bem como a atividade angiogênica e o potencial de cicatrização.

1.3 – Avaliações das atividades genotóxica e antigenotóxica

A informação genética está contida no DNA e é transmitida para cada célula de forma conservada e replicada. Entretanto, o DNA pode sofrer lesões por agentes genotóxicos (agentes químicos, físicos ou biológicos) modificando sua estrutura, e que são denominadas de mutações (Ribeiro, 2003).

Os agentes genotóxicos podem provocar ou aumentar o aparecimento de lesões no DNA das células somáticas e/ou germinativas. Já se conhece que as células podem reagir ao dano provocado, na tentativa de corrigir as agressões sofridas. Esse mecanismo é conhecido por processo de reparo ao DNA. Contudo, se o dano for removido antes da divisão, a célula restabelece a integridade do DNA e as funções são preservadas. Mas, se a divisão celular ocorrer antes do processo de reparo, o DNA replicará e poderá haver proliferação celular com as alterações, neste caso, a mutação será incorporada na seqüência do DNA (Brown *et al.*, 1994; Kada *et al.*, 1978).

A mutação nas células germinativas é responsável por produzir mudanças na hereditariedade, acarretando o desenvolvimento de efeitos teratogênicos e de desordens hereditárias múltiplas. Já nas células somáticas, pode propiciar a perda de controle da proliferação celular e levar o desenvolvimento de tumores. Assim, a detecção de agentes genotóxicos constitui um papel importante na validação do potencial carcinogênico, pois os

mecanismos de mutagênese e carcinogênese estão intrinsecamente relacionados (Riberio, 2003; Vijg, 2000).

A carcinogênese envolve a mutação seqüencial de genes controladores de crescimento, expansão clonal e progressão das células, resultando em células pré-neoplásicas e neoplásicas. Mudanças que levam ao desenvolvimento das neoplasias são supostamente geradas por alterações na seqüência do DNA e produção de proteínas funcionalmente aberrantes (Alberts *et al.*, 2004). Segundo Moustacchi (2000), a mutação, geralmente, é provocada pelo contato do indivíduo com mutágenos. Essa exposição é constante e envolve mutágenos endógenos e exógenos ou ambientais.

A porta de entrada dos carcinógenos químicos no indivíduo é pela via oral, pele e outras, onde alcançando a célula, promovem alterações no metabolismo que afetam um ou mais eventos, possibilitando a formação da neoplasia maligna (Moustacchi, 2000; Brown *et al.*, 1994).

Estudos epidemiológicos mostram que há relação entre neoplasias e hábitos alimentares, pois os alimentos podem conter mutágenos e/ou carcinógenos. Mas, outros mutágenos e/ou carcinógenos são originados durante o processo de preparo dos alimentos, por exemplo, a formação de nitrosaminas ocorre durante o cozimento de carnes. Essas aminas estão relacionadas com o carcinoma do aparelho digestório, especialmente, estômago (Karakaya & Kavas, 1999). A via oral, através de chás, infusões e outros preparados, é a principal porta de entrada de mutágenos originados

das plantas. Porém, a maioria destas substâncias ainda não foi estudada, no que se refere ao potencial citotóxico e genotóxico. Assim, será necessário avaliar as diversas atividades biológicas das plantas medicinais para propiciar o uso com segurança (Bagatini *et al.*, 2007; Schenkel *et al.*, 2003).

Por outro lado, existem substâncias naturais ou sintéticas que protegem o DNA do dano ou modulam a ação do agente genotóxico. Essas substâncias são conhecidas por agentes antigenotóxicos ou antimutagênicos (Waters *et al.*, 1996).

As substâncias antimutagênicas podem ser classificadas em desmutagênicos e bio-antimutagênicos. Os desmutagênicos desempenham a sua atividade protetora por inativação das substâncias mutagênicas antes que elas atuem sobre o DNA. Já os bio-antimutagênicos são capazes de suprimir a mutação por interferirem sobre os processos metabólicos de reparação inerentes à célula (Kada *et al.*, 1978).

Atualmente, substâncias antimutagênicas têm despertado interesse pela comunidade científica e também das indústrias farmacêuticas, pois esses agentes apresentam propriedades que podem ser empregados para a prevenção de danos ao DNA (Moustacchi, 2000).

Pesquisas sobre antigenotoxicidade apresentam potencial promissor, pois poderiam vir a elucidar a efetividade de algumas substâncias antigenotóxicas, encontradas nas plantas usadas na medicina popular (Veiga-Jr, 2008; Yunes & Calixto, 2001). A prevenção de neoplasias malignas seria

diminuir a exposição da célula a mutágenos e carcinógenos e também pela utilização de substâncias que atenuam a ação de agentes genotóxicos (Bagatini et al., 2007).

Realmente, na dieta humana encontra-se uma rica e complexa mistura de compostos genotóxicos e antígenotóxicos. Já se conhece que as plantas também possuem substâncias que apresentam propriedades antígenotóxicas e anticarcinogênicas como as fibras, compostos polifenólicos, isoflavonas, vitaminas (A, B, C, E e outras), dentre outras (Hiramatsu *et al.*, 2004; Karakaya & Kavas, 1999). Muitos compostos antígenotóxicos são agentes antioxidantes e atuam seqüestrando os radicais livres de oxigênio (Khan *et al.*, 2005; Malins *et al.*, 2002).

Assim, o uso freqüente de substâncias antígenotóxicas e anticarcinogênicas é um meio de prevenir doenças degenerativas e neoplásicas. Várias substâncias de uso frequente na terapia alopática e homeopática são provenientes das plantas (Veiga-Jr, 2008).

Para avaliar a atividade genotóxica e/ou antígenotóxica de agentes físicos, químicos e biológicos existem uma variedade de testes laboratoriais *in vivo* e *in vitro*.

1.4 - Testes utilizados para detecção da atividade genotóxica

Atualmente, vários testes em curto prazo têm sido empregados na avaliação da genotoxicidade (Pinto & Felzenszwalb 2003), entre os quais podem ser destacados principalmente os seguintes ensaios.

1.4.1 – Teste de mutagenicidade de Ames

O Teste de mutagenicidade de Ames é uma metodologia de triagem amplamente utilizada para detectar substâncias mutagênicas ou potencialmente carcinogênicas. O teste é realizado empregando mutantes das linhagens de *Salmonella typhimurium*, auxotrófica para o aminoácido histidina, que pode vir a sofrer a mutação reversa para a prototrofia em relação a síntese deste aminoácido. O teste consiste então, na avaliação do número de revertentes produzidos na cultura bacteriana pela incubação das células com o composto em estudo. Devido à composição do meio, só formarão colônias as células prototróficas para a histidina, provenientes de mutações espontâneas ou pela reversão induzida pelos agentes indutores. As linhagens utilizadas de *Salmonella typhimurium* são especialmente construídas para detectar produtos que causam mutações gênicas por deslocamento do quadro de leitura (*frameshift*) ou por substituição dos pares de base do DNA em seus genomas. Possuem várias mutações do tipo *rfa*, *uvrB* e plasmídeo pkM101, que aumentam sua sensibilidade aos agentes genotóxicos, bem como vários

mutágenos no operon de histidina, que serão os alvos para a mutação reversa (Maron & Ames, 1983).

O consenso atual indica que o Teste de Ames é uma ferramenta fundamental no conjunto de teste que define a potencialidade de ação para compostos carcinogênicos genotóxicos (Ribeiro *et al.*, 2003).

1.4.2 – Teste do Cometa

O teste do cometa, também conhecido por *Single Cell Gel Electrophoresis*, é um teste utilizado para detectar lesões genômicas que podem resultar em mutação. Diferentemente das mutações, as lesões detectadas pelo teste do cometa podem ser corrigidas e assim, o teste pode ser utilizado para estudos de reparo do DNA, possibilitando a obtenção de informações sobre a cinética e o tipo de lesão reparada, entretanto não permite concluir a respeito da precisão do processo de reparo (Valverde & Rojas, 2009; Dusinska & Collins, 2008)

O princípio do teste do cometa se baseia na avaliação do dano da molécula do DNA. Para sua detecção, células de eucariontes são embebidas em agarose e lisadas por detergentes e as proteínas nucleares extraídas por solução de cloreto de sódio a 2,5 M. Forma-se uma estrutura residual semelhante a um núcleo, designado por “nucleóide” que é uma série de alças enoveladas de DNA sem histonas, aderidas a matriz nuclear residual. Caso existam quebras na molécula de DNA, a estrutura do nucleóide sofre mudanças, visto que as alças de DNA se desenovelam formando um halo

(Eriksson et al., 2002; Cook & Brazell, 1977). As células que apresentam núcleos redondos são consideradas sem dano detectável no DNA. Já as células que apresentam lesões são identificadas visualmente por uma cauda, semelhante a um cometa (Singh et al., 1988), que é formada pelos fragmentos de DNA, de diferentes tamanhos, significando danos no ácido desoxirribonucléico (Speit et al., 2009; Mozaffarieh et al., 2008;). Na figura 2 mostra as células analisadas pelo teste do cometa.

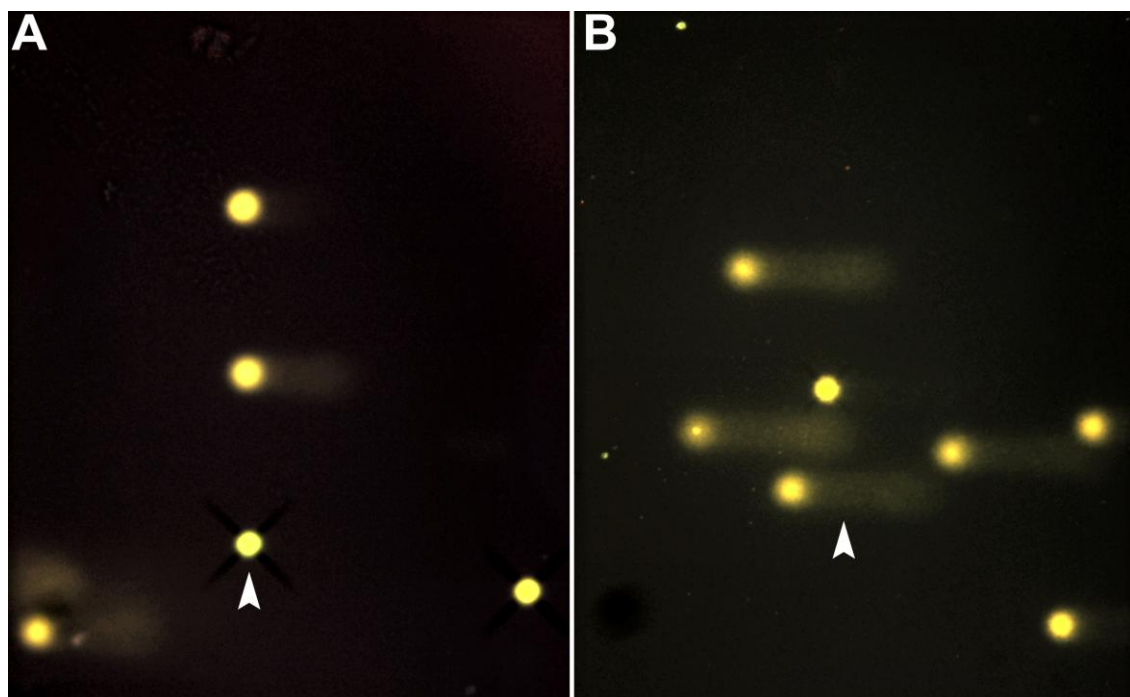


Figura 2 – Fotomicrografia de células analisadas pelo teste do cometa. A seta em “A” mostra uma célula normal. A seta em “B” mostra uma célula em “cometa”.

Após a eletroforese, as células que apresentam núcleos redondos são consideradas sem dano detectável no DNA. Já as células que apresentam lesões são identificadas visualmente por uma cauda, semelhante a um

cometa, que é formada pelos fragmentos de DNA, de diferentes tamanhos, significando danos no ácido desoxirribonucleíco (Speit *et al.*, 2009; Mozaffarieh *et al.*, 2008;). Na figura 3 exemplifica o grau de lesão do DNA pelo teste do cometa.

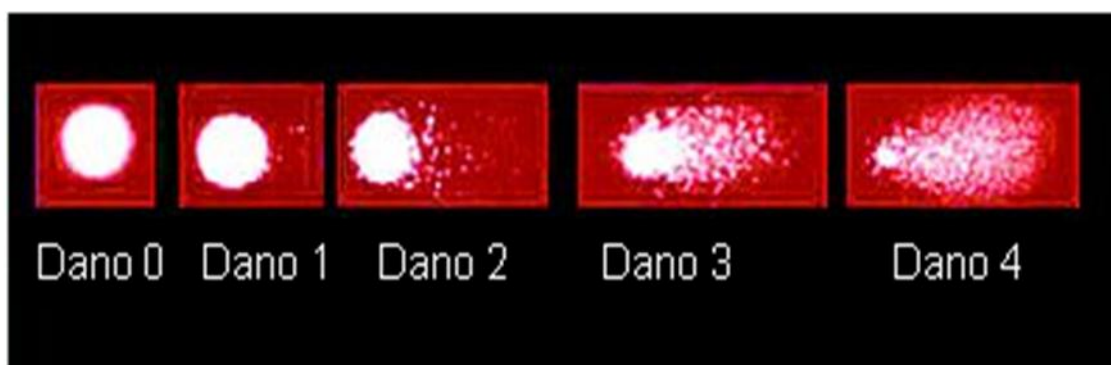


Figura 3 – Quantificação do grau de lesão do DNA detectado pelo teste do cometa

O tamanho, a intensidade da fluorescência, aspecto e outras características dos cometas são mensurados por microscopia ou por programas específicos de análise de imagem (Tice, 1995). Entretanto já existe no mercado *software* que analisa e interpreta imagens dos cometas (Mozaffarieh *et al.*, 2008).

O teste do cometa é muito utilizado em várias áreas da genética, em toxicologia, biomonitoramento ambiental, genotoxicidade, além de outras aplicações (Valverde & Rojas, 2009; Speit *et al.*, 2009; Dusinska & Collins, 2008; Mozaffarieh *et al.*, 2008).

1.4.3 – Teste Microsatélite

Os microsatélites são sequências repetitivas de DNA conhecidas como marcadores SSR (*Simple Sequence Repeat*) ou STR (*Short Tandem Repeat*). Essas repetições são constituídas por blocos de 1 a 6 nucleotídeos dispostos em *tandem* (Oliveira *et al.*, 2008; Kupper *et al.*, 2008). Nos eucariotos, os microsatélites encontram-se dispersos principalmente em sequências não codificantes do genoma, cujos *loci* são conservados em uma mesma espécie ou parcialmente conservados entre espécies relacionadas (Oliveira *et al.*, 2008; Kawashima *et al.*, 2006). Por apresentarem variações inter-individuais no número de repetições de um único *locus*, os alelos microsatélites são marcadores altamente polimórficos (Küpper *et al.*, 2008). Adicionalmente, esses marcadores são frequentemente ligados a genes herdados com padrão Mendeliano (Ellegren, 2004). A elevada informatividade desses alelos polimórficos pode ser investigada com reprodutibilidade e especificidade pela reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando *primers* flangeadores de um *locus* microsatélite específico (Kupper *et al.*, 2008; Ellegren, 2004).

A alteração somática do número de unidades de repetição em um *locus* microsatélite é conhecida como instabilidade de microsatélite. O acúmulo dessas mutações caracteriza um fenótipo mutante causado por deficiência no sistema de reparo do DNA, em especial, durante a replicação. O fenótipo mutante é uma via alternativa à via clássica de tumorigênese, que apresenta predominantemente mutações cromossômicas (Oliveira *et al.*, 2008;

Kawashima *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2003). Por outro lado, a alta taxa de mutação, de 10^{-2} a 10^{-6} //locus/geração, torna os microssatélites potenciais marcadores de exposição a mutágenos ambientais, como relatado em vegetais e animais expostos a radiação ionizante ou mutágenos químicos (Kupper *et al.*, 2008; Ellegren, 2004).

1.4.4 - Teste do Micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*

Um dos testes *in vivo* muito utilizado na avaliação da ação clastogênica e/ou aneugênica de composto é o teste do micronúcleo em medula óssea de camundongo. Este ensaio é amplamente aceito pelas agências internacionais e instituições governamentais como parte dos ensaios recomendados para se estabelecer a avaliação e o registro de novos produtos químicos e farmacêuticos (EPA, 2001, Rabello-Gay *et al.* 1991; Garcia, 1987).

Heddle (1973) e Schimid (1975) propuseram, independentemente, o teste do micronúcleo (MN), como alternativa simples na avaliação dos danos cromossômicos. O teste do MN foi baseado na observação de corpos de Howell-Jolly descritos pelos hematologistas em células hematopoiéticas. O protocolo foi primeiramente utilizado em células da medula óssea.

O teste do MN em medula óssea de roedores é um ensaio *in vivo* amplamente utilizado para detecção de agentes genotóxicos e também antigenotóxicos.

Os MNs aparecem nas células filhas, em decorrência de danos induzidos nas células parentais. Os dois fenômenos básicos que acarretam na formação do MN em células mitóticas são a quebra cromossômica e a não disjunção no aparato mitótico. (Ribeiro *et al.*, 2003; Heddle 1973).

Os MNs são pequenos corpúsculos cromatídicos semelhantes em estrutura ao núcleo (Figura 4), formados por parte de cromossomos acêntricos ou cromatídicos e cromossomos inteiros ou cromátides que se atrasaram na anáfase e não foram incluídos no núcleo da célula-filha na telófase durante o processo de divisão celular (Figura 5). Por esta característica, qualquer fragmento ou cromossomo inteiro separados do núcleo principal, formam um pequeno núcleo localizado no citoplasma celular, que é denominado de micronúcleo (Alberts *et al.*, 2004).. O teste do MN foi inicialmente desenvolvido em eritrócitos de medula óssea hematopoiética (MOH) de camundongos (Schmid, 1975), mas é também realizado em ratos (Ribeiro, 2003).

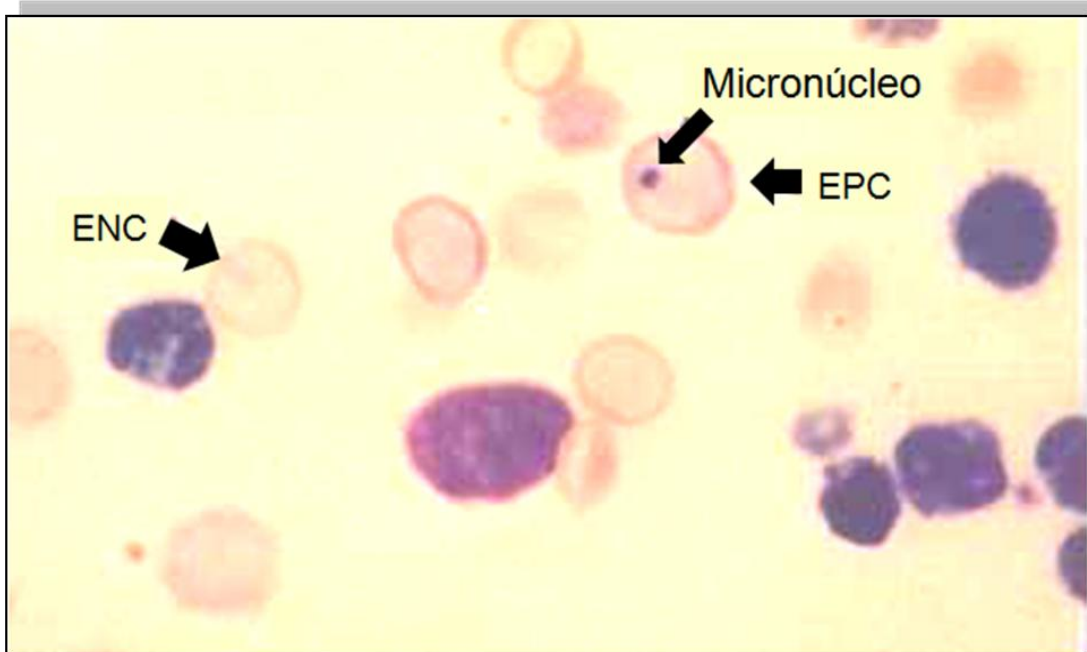


Figura 4 – Observação de eritrócitos com policromáticos micronucleados (indicados pelas setas) em esfregaço de sangue da medula óssea de camundongo. ENC – Eritrócito normocromático. EPC – Eritrócito policromático. Fotomicrografia obtida pela câmera JVC TK1270 acoplado ao microscópio para captura das imagens usando placa Pinnacle Studio AV/DV Deluxe.

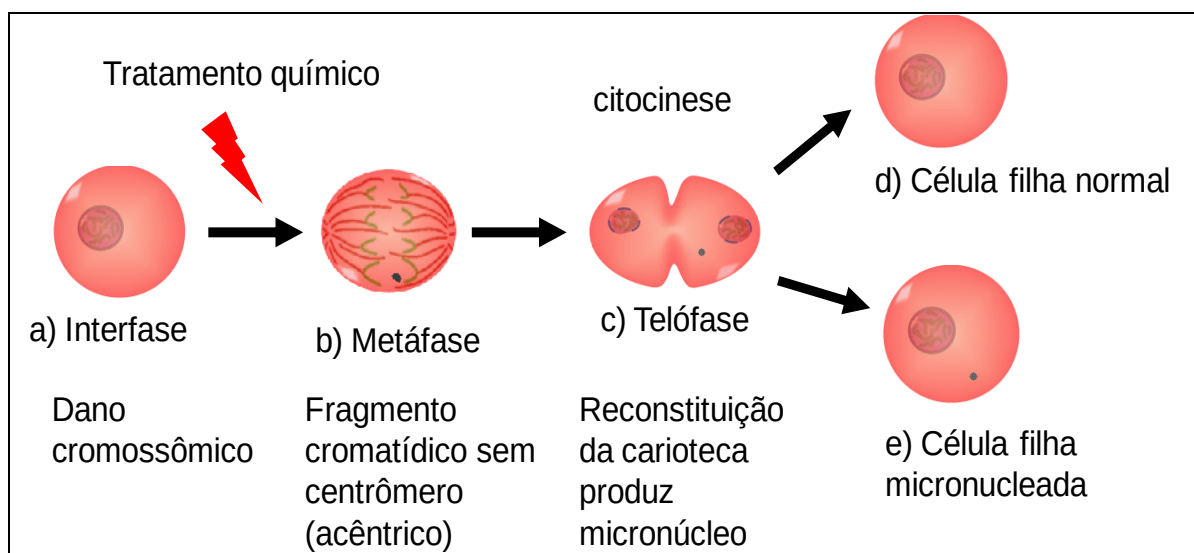


Figura 5 – Formação da célula micronucleada contendo um fragmento cromatídico acêntrico. Item a - dano cromossômico na interfase. Item b - formação de um

fragmento cromatídico (sem centrômero) que pode ser visualizado quando os cromossomos são condensados na metáfase da mitose. Item c - Reconstituição da membrana nuclear ao redor do fragmento cromatídico produz micronúcleo. Item d – identificação e quantificação da célula filha micronucleada. Esquema elaborado segundo Ribeiro *et al.* (2003), em PowerPoint® 2007, da Microsoft®.

Os eritroblastos normalmente localizados na MOH são os precursores dos eritrócitos do sangue periférico de mamíferos (Figura 6) e apresentam uma alta e constante produção para a reposição das hemácias maduras retiradas da circulação (hemólise fisiológica). O eritroblasto ao expelir seu núcleo para formar os eritrócitos policromáticos (EPC), os MNs formados permanecem no citoplasma onde podem ser identificados. Os EPC, que após a coloração, apresentam o citoplasma corado mais basofilicamente (RNA-positivos) que as eritrócitos mais maduros, eritrócitos normocromáticos, que apresentam o citoplasma corados neutrofilicamente (ENC). Os resultados da análise genotóxica dos agentes em estudo são expressos pela frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) em 2000 ENC por animal. A substância teste é considerada mutagênica quando a frequência de EPC é significativamente superior ($p < 0,05$) em relação ao controle negativo (Falck *et al.*, 2003; Norppa *et al.*, 2003).

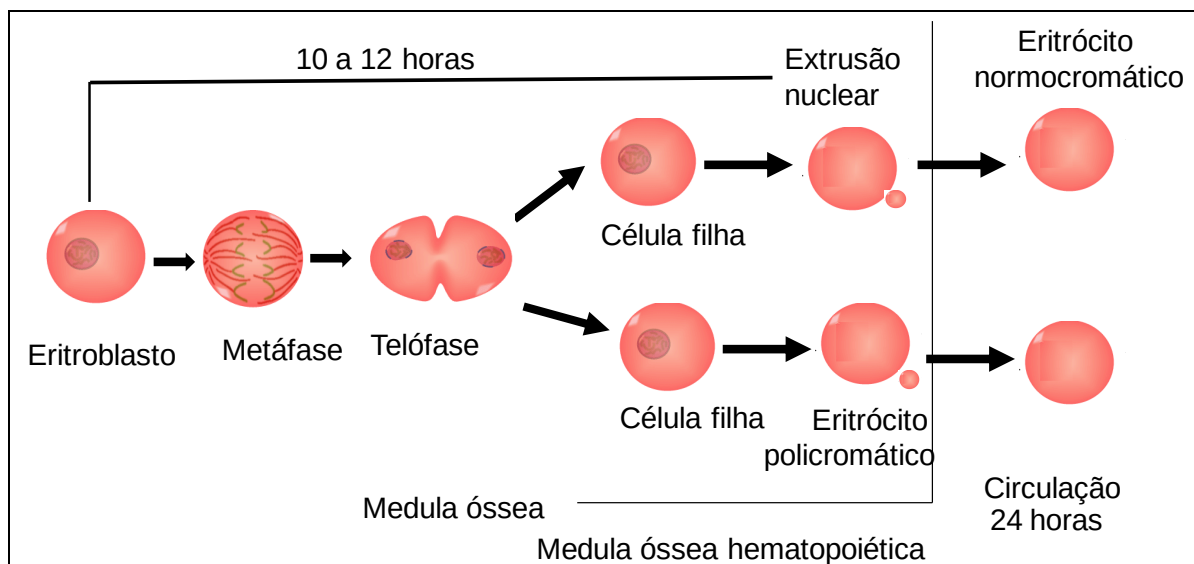


Figura 6 – Processo de maturação normal das células da linhagem eritrocitária. Esquema elaborado segundo Lorenzi (2006), em PowerPoint® 2007, da Microsoft®.

O teste do MN em MOH tem sido largamente utilizado na avaliação do potencial genotóxico de agentes físicos e químicos (Ding *et al.*, 2003, Chung *et al.*, 2002), no biomonitoramento de populações humanas ocupacionalmente expostas a agentes mutagênicos (Bolognesi *et al.*, 2004), na pesquisa de compostos inibidores de carcinogênese (Roy *et al.*, 2003) e em estudos ecotoxicológicos (Llorente *et al.*, 2002; Gauthier *et al.*, 1999). É um método eficaz e possível de ser realizado com baixo custo (Rosefort *et al.*, 2004). O ensaio do MN pode ser executado em qualquer população de células que estejam em constante divisão. Nesse caso, a medula óssea hematopoiética de mamíferos é indicada para o estudo, uma vez que as células levam de 10 a 24 horas para completar um ciclo de divisão (Ribeiro, 2003).

1.5 – Atividade angiogênica

Já se conhece na literatura que produtos de origem vegetal apresentam substâncias indutoras de angiogênese (Wang *et al.*, 2004).

A potencialidade e possibilidade de aplicação clínica de substâncias indutoras de angiogênese são vastas, por exemplo no aumento da vascularização miocárdica, no reparo do sistema nervoso central após traumatismo ou isquemia; substituições arteriais de grande calibre, no tratamento de doenças neoplásicas, no processo de cicatrização de feridas e reparo tecidual (Folkman, 2004; Donà *et al.*, 2003; Folkman, 1972).

Angiogênese é definida como sendo a formação de novos vasos sanguíneos por um processo de germinação de brotos endoteliais a partir de vasos capilares preexistentes (Folkman & Ingber, 1992). A angiogênese apresenta importante função nos processos fisiológicos normais e nos processos patológicos (Dvorak, 2005). Nos processos fisiológicos como a menstruação, ovulação, nidação, recuperação de tecidos lesados, cicatrização de feridas são dependentes da ação angiogênica. Nos processos patológicos, a angiogênese participa de afecções como artropatias crônicas, psoríase, retinopatia diabética, crescimento tumoral e disseminação metastática (Gough 2007; Saflate *et al.*, 2002; Gonzalez *et al.*, 2000; Hard 1998; Folkman 1976).

A angiogênese é um mecanismo controlado por fatores ativadores e inibidores, que se desencadeiam quando algum estímulo induz a mudança das células endoteliais de um estado de quiescência para um estado de replicação, migração e formação de capilares (Saflate *et al.*, 2002). Esta é ativada por meio do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), que é uma proteína com atividade mitogênica e possui importante função na sobrevivência das células do endotélio vascular. O VEGF exerce sua atividade biológica através de receptores transmembrânicos com atividade tirosina quinase presente nas células endoteliais, e participa como principal mediador da angiogênese (Ferrara, 2004; Li *et.al.*, 2003; Dvorak, 2002).

O VEGF foi identificado, caracterizado e purificado por Ferrara e Henzel (1989). A partir de então, entendeu-se a função do VEGF na regulação da permeabilidade vascular e na angiogênese, a qual durante o processo de reparo tecidual contribui para o aumento do fluxo sanguíneo, oxigenação, suprimento de nutriente e eficiência na remoção de catabólitos (Bates *et.al.*, 1999; Ferrara & Henzel, 1989).

Além do VEGF, existem outras moléculas que foram identificadas como ativadoras da angiogênese, como o fator de crescimento de fibroblasto-a (aFGF), bFGF, fator de crescimento transformante alfa (TGF- α), TGF- β , fator de necrose tumoral (TNF- α), angiogenina, angiotropina, angiopoetina-1, interleucina-8 (IL-8), trombospondina entre outros (Folkman & Shing, 1992; Risau, 1997). Entretanto, apesar da existência de vários fatores, há nítidas evidências de que VEGF apresenta importante função nos processos normais

e patológicos da angiogênese dos organismos. As moléculas ativadoras da angiogênese parecem induzir a angiogênese de forma indireta, estimulando a produção de VEGF e FGF básico por macrófagos, células endoteliais e células inflamatórias (Ferrara, 2004). Já se sabe que durante a resposta inflamatória os leucócitos (neutrófilos, monócitos/macrófagos e linfócitos T), e fibroblastos contribuem para formação de microambiente favorável a angiogênese (Zijlstra, *et. al.*, 2006).

As células endoteliais estimuladas pelos fatores angiogênicos liberam proteases que atuam favoravelmente na reparação do vaso sanguíneo lesado. As células endoteliais migram para o estroma perivascular, onde proliferam e iniciam o brotamento capilar. A migração das células segue em direção ao local de estimulação angiogênica. O broto endotelial expande, formando novos vasos sanguíneos (Gough, 2007; Ferrara, 2004). Na figura 7, apresenta esquema do processo angiogênico.

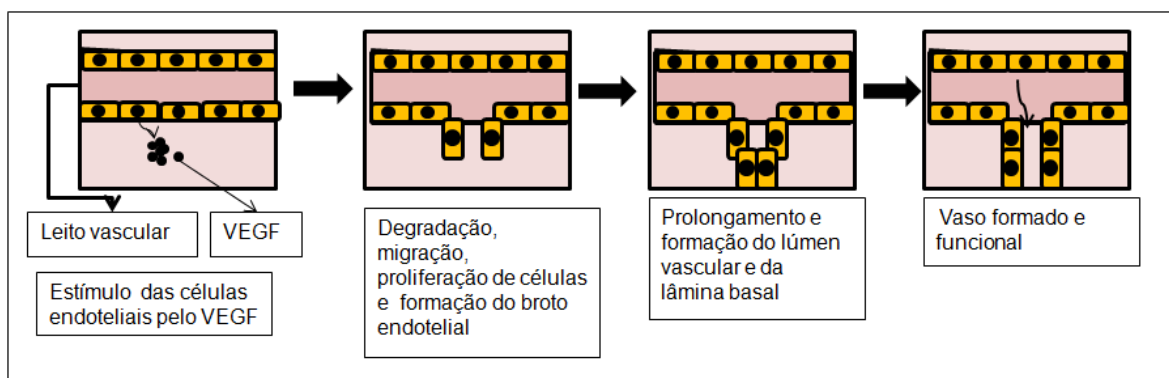


Figura 7 – Esquema representativo do processo angiogênico, elaborado segundo Ferrara (2004), em PowerPoint® 2007, da Microsoft®.

Atualmente, tem sido dado ênfase ao estudo das substâncias provenientes de plantas que apresentam propriedades angiogênicas e antiangiogênica (Folkman, 2004; Jones, 2004).

As plantas da família das *Euphorbiaceae* apresentam como característica geral uma seiva conhecida por látex (Grosso, 2004) que é utilizado na medicina popular como substância angiogênica (Mendonça 2004; Mrué 2000).

Mrué (1997), trabalhando com látex da *Hevea brasiliensis* (seringueira) constatou que o látex apresentava substâncias ativadoras da angiogênese, promovendo a regeneração e formação de um novo esôfago em cão que foi previamente e parcialmente removido. Posteriormente, Mrué (2000) utilizou uma membrana constituída do látex e demonstrou que a membrana foi capaz de induzir a angiogênese em córnea de coelho. Com a mesma membrana Sader *et al.*(2000) fizeram substituição parcial do pericárdio de cães e observaram que houve a regeneração do pericárdio nativo. Em 2003, Oliveira e colaboradores realizaram a miringoplastia utilizando-se a membrana desse látex e constataram que membrana promoveu a regeneração do tímpano.

Os trabalhos realizados anteriormente evidenciaram a presença da atividade angiogênica do látex da *Hevea brasiliensis*. O uso popular do látex de outras espécies da família das *Euphorbiaceae* como medicamento é muito disseminado em várias regiões do Brasil e inclusive em Goiás (Ortencio, 1997). O látex da *S. umbellatum* é amplamente utilizado pela população por

suas diversas atividades biológicas apresentadas, principalmente pela ação de cicatrização de feridas.

A atividade angiogênica pode ser avaliada por vários modelos experimentais como o ensaio da angiogênese em córnea de coelhos, ratos ou camundongos e também ensaio de implantes no tecido subcutâneo de animais que permitem avaliar crescimento de tecidos (Vargas *et al.*, 2007). O modelo experimental do presente estudo utilizando membrana corio-alantóidea (CAM) do ovo embrionado de galinha apresenta vantagens como reprodutibilidade do ensaio, baixo custo, facilidade de observação da rede vascular formada (Ribati *et al.*, 1996).

A CAM é uma membrana transparente e altamente vascularizada que é utilizada na avaliação da angiogênese ou anti-angiogênese da substância testada. A qualidade dos vasos recém-formados depende do estímulo das substâncias angiogênicas ou anti-angiogênicas que podem favorecer ou inibir a vascularização da CAM (Zwadlo-Klarwasser *et al.*, 2001; Ribati *et al.*, 1996).

A principal função da CAM é a de servir como órgão respiratório para o embrião de galinha. A CAM também desempenha um papel no armazenamento de excreções, transporte de eletrólitos (sódio e cloreto) do saco alantóide, e mobilização de cálcio provindo da casca do ovo (Vargas *et al.*, 2007). A figura 8 apresenta a membrana corio-alantóidea do ovo embrionado de galinha

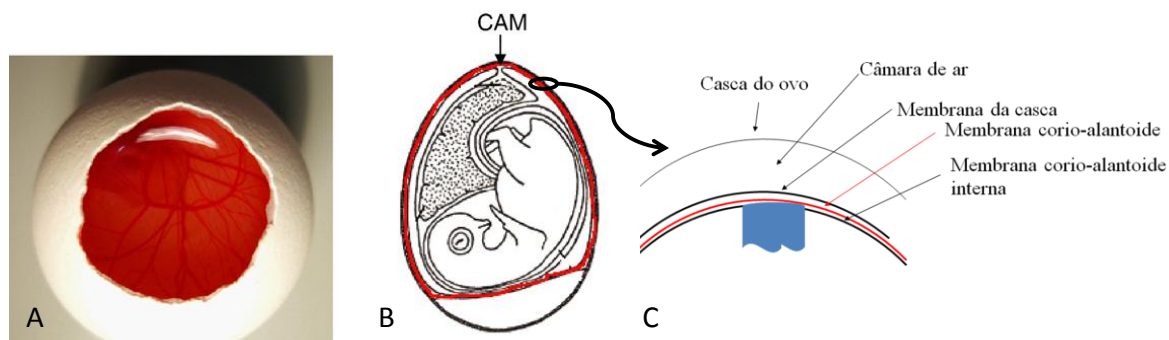


Figura 8 – Membrana corio-alantóidea do ovo embrionado de galinha. A figura A apresenta imagem da abertura da casca do ovo de galinha e exibe a CAM vascularizada (Fotografia obtida com câmera digital Sony Cyber-Shot – 6.0 mega pixels). A figura B apresenta em vermelho a extensão da CAM no ovo embrionado e a Figura C, esquema ilustrativo das membranas que constituem o ovo embrionado de galinha. As Figuras B e C foram elaboradas em PowerPoint 2007 (Microsoft), de acordo com informações de Vargas *et al.*, (2007).

Na avaliação da atividade angiogênica ou anti-angiogênica, a substância teste é aplicada na superfície da CAM e posteriormente, observa-se o efeito estimulador ou inibidor da angiogênese pela formação da área da rede vascular (Ribatti *et al.*, 1996; Wilting *et al.*, 1992). A figura 9 apresenta a rede vascular formada em diferentes controles. Esquema ilustrativo das membranas que constituem o ovo embrionado de galinha.



Figura 9 – Fotografia digital apresentando a rede vascular formada, de acordo com a substância recebida. Nota-se a presença de maior número de vasos sanguíneos na rede vascular do controle estimulador. Fotografia obtida com câmera digital Sony Cyber-Shot – 6.0 mega pixels.

A CAM do ovo embrionado de galinha é formada pela fusão do mesoderma somático do corion com a mesoderma esplânico do alantóide durante os 4 a 5 primeiros dias do desenvolvimento embrionário (Vargas *et al.*, 2007; Ribatti *et al.*, 1996; Allen & Wilson, 1993; Staton *et al.* 2004).

A proliferação vascular é intensa e continua até o décido-primeiro dia, posteriormente há diminuição significativamente (Vargas, *et al.*, 2007). A partir do 13^o dia não haverá crescimento vascular na CAM e segundo Wilting *et al.* (1992) pode ser usada para estudar o efeito de fatores de crescimento, ou seja, são utilizadas na avaliação de substâncias angiogênicas ou anti-angiogênicas (Vargas *et al.* 2007; Ribatti, *et al.*, 1996; Rizzo *et al.*,1995).

Durante o desenvolvimento do embrião de galinha, o sistema linfático do embrião não está inteiramente desenvolvido, comportando como hospedeiro naturalmente imunodeficiente. A condição de imunodeficiência permite que as substâncias químicas avaliadas quanto as atividades angiogênica e anti-

angiogênica na CAM não desempenham efeito antigênico e não induzem a resposta imunológica, permitindo, dessa maneira, uma avaliação mais precisa, sem interferentes imunológicos. O ensaio na CAM também pode avaliar a ação tóxica da substância em teste, determinada pela morte do embrião (Vargas *et al.*, 2007).

1.6 – Processo cicatricial

Vários estudos encontrados na literatura têm mostrado que os componentes fitoquímicos dos vegetais promovem o processo de cicatrização, favorecendo positivamente a contração e a epitelização da ferida. Assim, estudos que apresentam como objetivo a avaliação do potencial de cicatrização de feridas induzidos por substâncias vegetais são promissores. (Deshmukha *et al.*, 2009; Pesin *et al.*, 2009; Nayak *et al.*, 2007; Farnsworth *et al.*, 1985).

A cicatrização de feridas pode ser avaliada utilizando vários modelos experimentais. Na literatura são descritos ensaios que usam animais como pombo, camundongo, rato, gato, cachorro, coelho, porco e outros. (Chiquetti-Junior *et al.*, 2007; Mustoe *et al.*, 1991; Billingham & Russel, 1954; Loeb 1919; Carrel & Hartmann, 1916). Entretanto, no presente estudo, foi utilizado como modelo experimental de cicatrização, a pele do dorso de ratos, da linhagem Wistar, devido à facilidade de manuseio e acomodação, resistência à

manipulação, agressões cirúrgicas e a processos infecciosos, e também por ser o animal amplamente utilizado em estudos experimentais de cicatrização de pele (Chiquetti-Junior *et al.*, 2007; Mustoe *et al.*, 1991).

A cicatrização de feridas é um processo dinâmico de reparação que se segue logo após a injúria de um tecido. Envolve uma complexa interação entre matrix extracelular, proteínas da coagulação, células parenquimais, leucócitos, hemácias, plaquetas e mediadores químicos. Imediatamente após lesão tecidual e endotelial, as plaquetas são ativadas e aderem ao colágeno no local da ferida, promovendo a formação do tampão plaquetário. A finalidade do tampão plaquetário é de impedir a perda de sangue, a invasão de microrganismo e é componente importante nas próximas fases do processo de cicatrização (Werner & Grose, 2003; Harding *et al.*, 2002; Tonnesen *et al.*, 2000).

As plaquetas ativadas sofrem degranulação, liberando fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformante- β (TGF- β), fator de crescimento epidérmico (EGF) e fator de crescimento transformante- α (TGF- α), além de glicoproteínas adesivas como a fibronectina e trombospondina, que são importantes constituintes da matriz extracelular provisória. As plaquetas ativam também a cascata da coagulação (May *et al.*, 2008; Roberts, 1998; Roberts & Sporn, 1996; Arnold & West, 1991). De fato, a cascata de coagulação e fatores de crescimento liberados pelas plaquetas, em conjunto com a ativação da cascata do complemento e ativação de células parênquimatosas produzem numerosos mediadores

vasoativos e fatores quimiotáticos, os quais, juntos, auxiliam no recrutamento das células inflamatórias ao local da ferida (Clark, 1996).

Para o local da injúria, são atraídos elementos inflamatórios, ativadores celulares e são liberados sinais moleculares e celulares visando promover a reconstituição tissular, o fechamento rápido da ferida, restauração da função tecidual e formação de uma cicatriz esteticamente satisfatória, similar ao tecido original (Eming *et al.*, 2007; Niessen *et al.*, 2001; Singer & Clark, 1999).

Segundo Clark (1993), o processo de cicatrização envolve três fases: inflamação, formação de tecido de granulação com deposição da matriz extracelular e remodelação. As fases podem ocorrer concomitantemente e a cicatrização é resultado das alternâncias sucessivas de reações anabólicas e catabólicas.

A inflamação é a fase de resposta do hospedeiro ao dano celular ou tecidual sofrido. É mediada por várias substâncias produzidas pelas células do tecido injuriado. No local da injúria, há aumento da permeabilidade vascular, retenção plasmática, proteíca, vasodilatação, recrutamento de células, liberação de substâncias quimiotáticas para os leucócitos e ativação da cascata da coagulação (Nayak & Pereira, 2006; Tonnesen *et al.*, 2000; Arnold & West, 1991).

Os leucócitos mais freqüentes na circulação sanguínea são os neutrófilos que migram para a região da ferida para formar de uma barreira de proteção contra a invasão de microrganismos (Simpson & Ross, 1972). Já os

monócitos infiltram-se no local da ferida e são ativados e transformam-se em macrófagos que são as principais células envolvidas no controle do processo de reparo (Singer & Clark, 1999; Arnold & West, 1991).

O macrófago é a maior célula efetora no processo de reparo tecidual, degradando e removendo componentes do tecido conjuntivo danificado, como colágeno, elastina e proteoglicanas. Atua também na fagocitose dos fragmentos celulares e secretam fatores quimiotáticos para atrair outras células inflamatórias ao local da ferida. Produzem prostaglandinas (potentes vasodilatadores) e fatores de crescimento, tais como o PDGF, o TGF- β , FGF e o VEGF, que se destacam como as principais citocinas necessárias para estimular a formação do tecido de granulação (Singer & Clark, 1999; Arnold & West, 1991).

Na fase de formação de tecido de granulação há proliferação das células endoteliais e síntese da matriz extracelular (Werner & Grose, 2003; Dvorak *et al.*, 2002). Há proliferação das células endoteliais levam a deposição de grandes quantidades de fibronectina na parede do vaso. Assim, para haver a angiogênese, é requerida a expressão de receptores para fibronectina pelas células endoteliais. A matriz extracelular é importante para o crescimento e manutenção normal dos vasos, pois além de agir como um suporte para a migração celular, também age como um reservatório e modulador da liberação de fatores de crescimento, como o FGF2 e o TGF- β , que são importantes na proliferação celular. (Werner & Grose, 2003; Clark, 1996).

Na fase de remodelagem do processo de cicatrização, ocorre uma tentativa de recuperação da estrutura tecidual normal, que é marcada por maturação das células endoteliais e ocorre deposição proteoglicanas e colágeno na matrix extracelular (Gabbiani *et.al.*, 1972). Ocorre também a reorganização da matriz extracelular, passando de provisória a definitiva, cujo aspecto fenotípico, reflete a forma da cicatriz. Com o decorrer do processo de maturação e remodelagem, a maioria dos vasos, fibroblastos e células inflamatórias desaparecem do local da ferida por meio de processos de emigração, apoptose ou outros mecanismos. Por outro lado, ainda havendo a presença elementos vasculares e celulares no local, ocorrerá a formação de cicatrizes hipertróficas e quelóides (Arnold & West, 1991).

Nas últimas décadas, vários estudos têm sido realizados no sentido de se identificar substâncias capazes de favorecer o processo de cicatrização. Também a busca de substâncias com atividade angiogênica tem sido intensa, pelo seu grande potencial de aplicação clínica. Dentre as substâncias que possuem ação direta no processo de cicatrização, destacam-se aquelas que apresentam atividade angiogênica, pois quando aplicados sobre a ferida, induzem a contração e fechamento mais rápidos (Vargas *et al.*, 2007; Nagai & Embil, 2002).

O SuL, popularmente designado como “Cola-nota”, é amplamente utilizada pela população como antiinflamatório, antitumoral e cicatrizante (Nogueira *et al*, 2007; Ortencio, 1997).

Devido à ampla utilização do SuL pela população e também a presença das atividades farmacológicas e biológicas descritas na literatura da família das *Euphorbiaceae* é que no presente trabalho objetivamos avaliar as atividades genotóxica, antigenotóxica, angiogênica e potencial de cicatrização do SuL, usando como modelo experimental o teste do micronúcleo em medula óssea de camundongo, a membrana corio-alantóidea do ovo embrionado de galinha e do potencial de cicatrização em feridas limpas em dorso de rato, respectivamente.

2 – OBJETIVOS

2.1 – Objetivos gerais

Analisar as atividades angiogênica, mutagênica e antimutagênica e o potencial de cicatrização do latex da *Synadenium umbellatum* (cola-nota).

2.2 - Objetivos específicos

2.2.1 – Avaliar a atividade angiogênica do látex da planta *Synadenium umbellatum*, utilizando como modelo experimental a membrana corio-alantóide de ovo embrionado de galinha.

2.2.2 – Avaliar a atividade mutagênica no látex extraído da planta *Synadenium umbellatum* utilizando como modelo experimental o teste do micronúcleo em medula óssea de camundongos.

2.2.3 – Avaliar a atividade antimutagênica no látex extraído da planta *Synadenium umbellatum* pelo tratamento simultâneo do látex da planta e de composto sabidamente genotóxico Mitomicina C (MMC), utilizando-se o teste do micronúcleo em medula óssea de camundongos.

2.2.4 – Avaliar o potencial de cicatrização em feridas limpas em dorso de ratos do látex da *Synadenium umbellatum*.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Teste do micronúcleo em MOH do camundongo

3.1.1 – Látex da *S. umbellatum*

O látex da planta *Synadenium umbellatum* Pax (1894) foi coletado na cidade de Goiânia-Goiás (16°37'40.94"S e 49°16'13.41"W). A exsicata do material contendo caule, folhas e flores foi realizada e depositada no Herbário do Instituto de Ciências Biológicas (Unidade de Conservação) da Universidade Federal de Goiás, sob número 40.006.

A seiva foi extraída através de incisão no tronco, a uma altura de 100 cm em relação ao solo. As células lactíferas drenaram um líquido de aspecto leitoso, denominado de látex, que foi coletado 1,0 mL diretamente em seringa de plástico estéril e transferido imediatamente para um recipiente de vidro estéril contendo 9 mL de água destilada, também estéril. Este material foi estocado a 4° C pelo período máximo de até 30 dias (Mendonça, 2004, Mrué, 1997). A concentração do látex puro foi de 1g/mL. Posteriormente, diluiu-se em água destilada para obtenção das concentrações de estudo de 10, 20, 50 e 100 mg/mL.

3.1.2 – Animais

Para realizar o teste do micronúcleo, foram utilizados 50 camundongos machos, saudáveis, da espécie *Mus musculus* “outbred” linhagem Swiss Webster, oriundo do Biotério Central da Universidade Federal de Goiás, apresentando peso corpóreo entre de $41,0 \pm 5,2$ g e faixa etária entre 2 e 3 meses no dias do experimento. Os animais foram alojados em gaiolas individuais de polipropileno, com piso sólido, forradas com serragem de madeira previamente esterilizada, conforme padrões internacionais. Os animais foram acomodados em ambiente com temperatura média de $24 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $55 \pm 5\%$; com ciclo de claro-escuro de 12 horas e tiveram água e alimentação *ad libitum*.

3.1.3 – Reagentes e Soluções

3.1.3.1 – Solubilização das células

- As células provenientes da MOH de camundongo foram solubilizadas em soro fetal bovino, produzindo por Laborclin Produtos para Laboratórios.

3.1.3.2 – Fixador

- Metanol absoluto – Labsynth Produtos para Laboratórios

3.1.3.3 – Tampão Fosfato (pH 6,0)

- Fosfato de sódio dibásico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$), Sigma-Aldrich Chemical Company
- Fosfato de sódio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), Sigma-Aldrich Chemical Company

Composição do tampão fosfato pH 6,0

Solução A

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$17,9 g

Água destilada.....100 ml

Solução B

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$344,5 g

Água destilada.....500 ml

Tampão fosfato pH 6,0

Solução A..... 74 ml

Solução B..... 426 ml

Água destilada.....1.500 ml

3.1.3.4 - Corante

- Tampão fosfato pH 6,0
- Giemsa, Doles Reagentes e Equipamentos para Laboratórios

Composição do Corante Giemsa tamponado*

Tampão fosfato pH 6,0.....	100 ml
Água destilada.....	100 ml
Solução Giemsa.....	9 ml

* Filtrado em papel filtro

3.1.4 – Controles

3.1.4.1 – Controle positivo

- Mitomicina C (MMC), Bristol-Myers Squibb

Solução de Mitomicina C

Mitomicina C.....	5mg
Água destilada estéril.....	5 ml

3.1.4.2 – Controle negativo

- Água destilada estéril

3.1.5 – Aprovação em comitê de ética

O presente trabalho foi aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa Médica Humana e Animal do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, protocolo n. 037/2008, de 26/06/2008.

3.1.6 - Procedimento Experimental

3.1.6.1 – Teste do Micronúcleo em medula óssea de camundongo

Os camundongos foram divididos em grupos de cinco animais cada. Foram tratados, intraperitoneal (ip), com doses do SuL de 10, 30, 50 e 100 mg.kg⁻¹ por peso corpóreo do animal por 24 horas. O grupo controle negativo foi tratado com água destilada estéril, enquanto que o grupo controle positivo recebeu dose única intraperitoneal de 4 mg.kg⁻¹ correspondendo a 80% da DL₅₀ de mitomicina C. Para a avaliação da antimutagenicidade, foram administrados as doses de 10, 30, 50 e 100 mg.kg⁻¹ do látex da *S. umbellatum* concomitantemente com uma dose de 4 mg.kg⁻¹ de MMC.

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os fêmures retirados. As epífises do fêmur foram cortados e a medula óssea lavada com 1 mL de soro fetal bovino. Após homogeneização em tubo de ensaio contendo a medula óssea e soro, o tubo foi centrifugado a 300 x g durante 5 minutos. O sobrenadante foi parcialmente descartado. O precipitado de células foi homogeneizado com pipeta de Pasteur. Uma gota de suspensão celular foi transferida para a lâmina de vidro onde foi feito o esfregaço celular. Após

secagem do esfregaço sangüíneo, todas as lâminas com os esfregaços foram fixadas em metanol absoluto durante 5 minutos e coradas em solução Corante de Giemsa tamponado, pH 6,8, por um período de 15 minutos (Heddle, 1973). Após este período, as lâminas foram lavadas em água corrente e deixadas secar em temperatura ambiente. A confecção dos esfregaços e contagens foram realizadas pelo procedimento “duplo-cego”.

3.1.6.2 – Analise Citogenética

A análise das lâminas foi realizada em microscópio óptico comum Nikon com a finalidade de se detectar possíveis alterações e/ou perdas cromossômicas (micronúcleos) nos eritrócitos policromáticos (EPC) da medula óssea dos animais submetidos aos diferentes tratamentos. As células foram visualizadas em objetiva de imersão (1000x), usando duas lâminas para cada animal, avaliando-se 1000 EPC por lâmina. Foi utilizada a média de duas lâminas como resultados. Para a avaliação da citotoxicidade, foram contados até 1.000 eritrócitos normocromáticos (ENC) e computados simultaneamente o número de eritrócitos policromáticos (EPC) e determinada a razão EPC/ENC.

3.1.6.3 – Análise estatística

As frequências de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) em 1.000 EPC de cada grupo foram comparadas em relação ao grupo controle negativo ou positivo pelo teste de ANOVA e todos os pares foram comparados pelo teste Tukey. Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$.

As frequências de EPC e ENC de cada grupo tratado com o látex foram comparadas com o grupo controle negativo ou positivo pelo teste qui-quadrado e foram considerados significativos valores de $p < 0,05$.

3.2 – Avaliação da atividade angiogênica na CAM

3.2.1 – Látex da *S. umbellatum*

O látex da planta *Synadenium umbellatum* Pax (1894) foi coletado na cidade de Goiânia-Goiás (16°37'40.94"S and 49°16'13.41"W). A exsicata do material contendo caule, folhas e flores foi depositada no Herbário do Instituto de Ciências Biológicas (Unidade de Conservação) da Universidade Federal de Goiás, sob número 40.006.

O látex foi obtido por incisão no tronco da árvore. A densidade do látex puro foi de 1g/mL. A solução aquosa de trabalho do SuL utilizada no estudo apresentou uma concentração de 10 e 20 mg/mL.

3.2.2 – Ovos embrionados de galinha

Foram utilizados 100 ovos férteis de galinha (*Galilus domesticus*) linhagem Rhoss, adquiridos junto ao Departamento de Zootecnia da Pontifícia Universidade Católica de Goiás.

3.2.3 – Drogas e reagentes

- H₂O estéril (HalexIstar Indústria Farmecêutica)
- Solução de dexametasona 4mg/mL – C₂₂H₂₉FO₅ - Aché Laboratórios Farmacêuticos, Lote nº 2668
- Biomembrana de látex - Biocure - Pele Nova Biotecnologia – Lote nº 04080100
- Formaldeído 37% - Rioquímica Ltda - Lote nº 0402296
- Parafina (Petrobrás)
- Coloração hematólina-eosina (HE)

3.2.4 – Procedimento experimental

Os ovos embrionados de galinha foram incubados em estufa automática durante os cinco dias a 37° C (±1° C) e com umidade entre 60 e 70% para a formação da membrana corio-alantóide (CAM).

No quinto dia de incubação, foi realizada na casca do ovo, na base maior, uma abertura circular de 1,0 cm de diâmetro, com auxílio de uma micro-retífica Dremel. Posteriormente, foi retirada a membrana da casca com o objetivo de expor a CAM e os ovos foram novamente incubados nas mesmas condições. Na figura 8A, mostra a forma da abertura na casca do ovo.

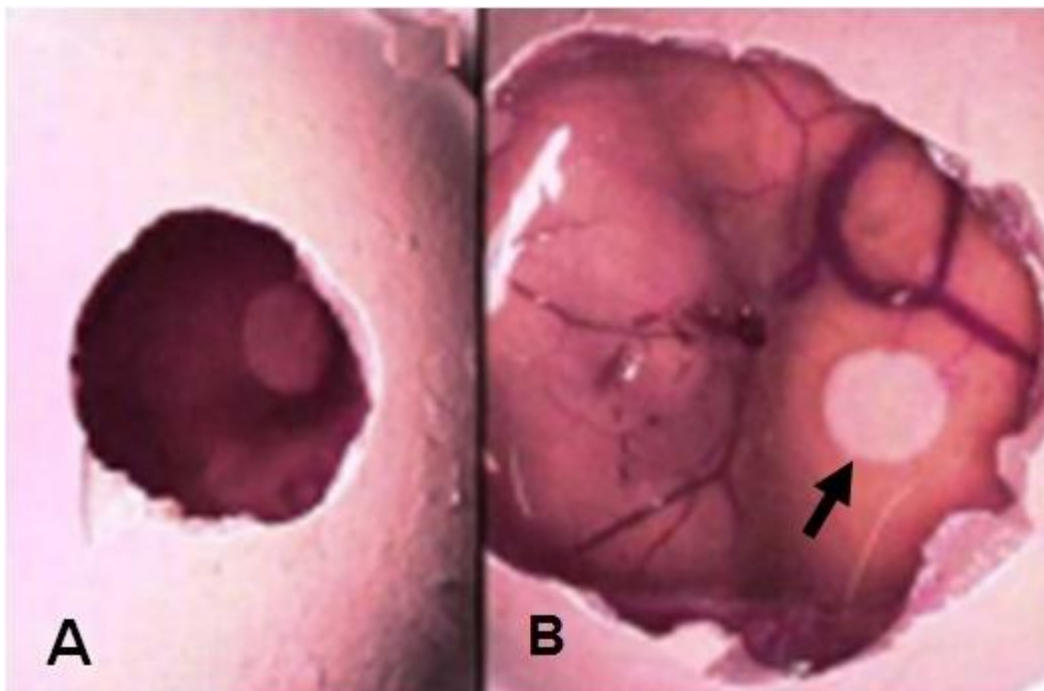


Figura 13 - A) - Observa-se os detalhes da abertura de 1,0 cm de diâmetro na casca do ovo. B) – Visão da rede vascular da CAM no 13º dia desenvolvimento, bem como, o papel de filtro (ponta da seta) que foi embebido com a substância (teste ou controles). Notar que o papel de filtro foi colocado próximo a um vaso sanguíneo calibroso da CAM. Fotografia obtida com câmera digital Sony Cyber-Shot – 6.0 mega pixels.

No 13° dia de incubação, discos de papel de filtro estéreis foram embebidos com 3 µL da solução aquosa de látex extraído da *Synadenium umbellatum*, nas concentrações de 10mg/mL e 20 mg/mL, juntamente com os controles e colocadas diretamente sobre a membrana corio-alantóide, permanecendo até o 16° dia (os detalhes podem ser visualizados na figura 8B). Nesse dia, as CAMs foram fixadas em solução de formol (10,0 % v/v) por 5 min, cortadas cuidadosamente e mantidas em placa de Petri com solução de formol.

3.2.5 – Obtenção da imagem e mensuração automatizada da angiogênese.

Através de câmara digital Sony Cyber-shot (6.0 mega pixels) foram obtidas as fotografias das CAMs sobre um fundo branco, em tamanho 640X480 pixels e formato de RGB 24 bites, padronizados com objetivo de analisar e quantificar a rede vascular formada.

Pela imagem capturada realizou-se a análise e a quantificação da rede vascular neo-formada. Determinou-se a área percentual de cada ensaio usando programas *Gimp for Windows (version 2.0.5)* e *Image J (versão 1.28)*. As imagens foram preparadas de forma que a saturação, brilho e contraste permitiram uma melhor resolução dos vasos sangüíneos que foram quantificados em pixels correspondentes. A quantidade dos pixels selecionada é proporcional ao nível de vascularização do campo de imagem

capturada (Doukas 2006a, 2006b; Mansur *et al.*, 2006; Blat *et al.*, 2004; Mendonça 2004).

3.2.6 – Análise histológica da CAM

A CAM do ovo embrionado de galinha com a rede vascular neo-formada foi fixada em solução de formaldeído a 10% e posteriormente incluídas em parafina. Cada bloco de parafina foi preparado e seccionado em micrótomo (Spencer) a 5 µm de espessura. Em seguida, foi corado pela hematoxilina-eosina, para estudos da vascularização em microscópio ótico comum (Zeiss-Axioskop).

As imagens foram obtidas através da câmera digital JVC-TK 1270 acoplado ao microscópico, pela placa de captura Pinnacle Studio AV/DV Deluxe.

3.2.6 - Análise Estatística

Para analisar a atividade angiogênica do SuL as percentagens das áreas obtidas da CAM dos grupos tratados e controles foram comparados por Krushal-Wallis (ANOVA não paramétrica) e, posteriormente, por comparação múltipla (Método de Dunn). O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

3.3 – Avaliação da cicatrização induzida pelo látex da *Synadenium umbellatum* Pax (1894) em ferida limpa no dorso de rato

3.3.1 – Látex da *S. umbellatum*

O látex da planta *Synadenium umbellatum* Pax (1894) foi coletado na cidade de Goiânia-Goiás (16°37'40.94"S and 49°16'13.41"W). A exsicata do material contendo caule, folhas e flores foi depositada no Herbário do Instituto de Ciências Biológicas (Unidade de Conservação) da Universidade Federal de Goiás, sob número 40.006.

O látex foi obtido por incisão no tronco da árvore. A densidade do látex puro foi de 1g/mL. A solução aquosa do SuL utilizada nesse estudo apresentou uma concentração de 10 mg/mL.

3.3.2 – Drogas e reagentes

- Soro fisiológico (Salina 0,9% -HalexIstar Indústria Farmecêutica)
- Xilazina - Aché Laboratórios Farmacêuticos, Lote nº 2668
- Quetamina
- Biomembrana de látex - Biocure - Pele Nova Biotecnologia – Lote nº 04080100

- Formaldeído 37% - Rioquímica Ltda - Lote nº 0402296

3.3.3 – Procedimento experimental

3.3.3.1 – Animais

Para realizar o estudo foram utilizados 15 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Rodentia mammalia) linhagem Wistar, machos, adultos apresentando peso corpóreo variando em 200 a 300g, procedentes do Biotério Central da Universidade Católica de Goiás e faixa etária entre 2 e 3 meses no dia do experimento. Os animais foram alojados em gaiolas individuais de polipropileno, com piso sólido, forradas com “maravalha”, esterilizada, conforme padrões internacionais. O ambiente teve temperatura média de 21°C, sistema de ventilação, ciclo de claro-escuro (claridade 07:00 -19:00, escuro 19:00-07:00). Para cada grupo foi oferecida alimentação e água *ad libitum*, durante todo o período do estudo.

3.3.3.2 – Anestesia, tricotomia e excisão da pele

Todos os animais foram anestesiados com quetamina (87 mg/kg) e xilazina (13 mg/kg) por via intraperitoneal. Após indução anestésica, os ratos foram posicionados em decúbito ventral, imobilizados em prancha de

acrílico, com contenção dos membros, por tensores elásticos e submetidos a tricotomia da região dorsal com máquina elétrica. Foi demarcado na região torácica dorsal cranial do animal (por um molde de plástico rígido), um retângulo com área equivalente a 6,8 cm². Realizou-se a excisão do fragmento constituído de pele e tecido subcutâneo.

O processo cicatricial foi avaliada por observação macroscópica da lesão nos 7, 14 e 21 dias.

3.3.4 – Grupos experimentais e tratamento tópico

Após a excisão da pele, os animais foram distribuídos aleatoriamente em 03 grupos de 5 animais.

GRUPO I – Controle – Solução salinaBiomembrana – Biocure®

GRUPO II – Controle Padrão – Biomembrana – Biocure®

GRUPO III – Teste – Solução aquosa do SuL – concentração 10mg/mL

Para o Grupo I, aplicou-se 5 mL de solução salina (0,9%) na lesão da pele. O procedimento foi repetido diariamente, até completar 21 dias após a incisão da pele.

No Grupo II, a biomembrana de látex da *Hevea brasiliensis* foi suturada na pele de cada animal. A troca do curativo foi realizada de 4 em 4 dias. Em cada troca, os animais foram anestesiados com quetamina e xilazina. O procedimento foi repetido diariamente, até completar 21 dias após a incisão da pele.

Para o Grupo III, foi aplicada na lesão da pele a 5 mL da solução SuL na concentração de 10 mg/mL. O procedimento foi repetido diariamente, até completar 21 dias após a incisão da pele.

3.3.5 – Avaliação da evolução da cicatrização

As imagens da área de ferida foram monitoradas pela câmara digital Sony Cyber-shot (6.0 mega pixels) em cada 7 dias e as contrações da área de ferida foram calculadas em percentagem da área de cicatrização da ferida.

3.3.6 – Análise Estatística

As áreas de feridas em diferentes grupos foram comparadas utilizando-se o teste Krushal-Wallis (ANOVA não paramétrica) e posteriormente utilizou um procedimento de compração múltipla (Teste de Tukey). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4 - REFERÊNCIAS

ABO, KA. 1988. Screening extracts of *Euphorbia garuana* N.E.Br. for *in vitro* cytotoxicity. *African Journal of Medicine and Medical Sciences*, 17 (4):. 227-230.

ALBERT, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERS, K.; WALTER, P. 2004. *Biologia Molecular da Célula*. Editora Artmed. 4ª Ed. Porto Alegre.

ALBUQUERQUE, U. P.; HANAZAKI, N. 2006. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. *Rev. bras. farmacogn.* 16(supl.): 678-89.

ANDERSON, D.; BASARAN, N.; BLOWERS, A.; EDWARDS, A.J. 1995. The Effect Of Antioxidants On Bleomycin Treatment *In Vitro* And *In Vivo* Genotoxic Assays. *Mutation Research*, Amsterdam, 329:37-47.

ARNOLD, F.; WEST, D.C. 1991. Angiogenesis in wound healing. *Pharmacol. Ther.* 52(3): 407-22.

BAGALKOTKAR, G., SAGINEEDU, S.R., SAAD, M.S., STANSLAS, J., 2006. Phytochemicals from *Phyllanthus niruri* Linn. and their pharmacological properties: a review. *J. Pharm. Pharmacol.* 58 (12): 1559–1570.

BAGATINI, M. D.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. 2007. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. Rev. Bras. Farmacogn. 17(3):444-447

BILLINGHAM, R.E.; RUSSELL, O. S. 1956. Studies on wound healing, with special reference to the phenomenon of contracture in experimental wounds in rabbits' skin. Ann. Surg. 144 (6): 961-981.

BOLOGNESI, C.; LANDINI, E.; PERRONE, E.; ROGGIERI, P. 2004. Cytogenetic biomonitoring of a floriculturist population in Italy: micronucleus analysis by fluorescence in situ hybridization (FISH) with an all-chromosome centromeric probe. 557 (2): 109-117

BOREK, C. 1991. Free radical processes in multistage carcinogenesis. Free Radic. Res. Commun. 12: 745–750.

BROWN, K.; KEMP, C.; BURNS, P.; BALMAIN, A. 1994. Importance of genetic alterations in tumour development. Arch. Toxicol. 16 (Suppl.): 253-260.

CARREL, A.; HARTMANN M, A. 1916. CICATRIZATION OF WOUNDS : I. THE relation between the size of a wound and the rate of its cicatrization. J. Exper. Med., 24:. 429-450.

CASTRO, D.B.; SANTOS, D.B.; FERREIRA, H.D.; SANTOS, S.C.; CHEN-CHEN, L. 2004. Atividades mutagênica e citotóxica do extrato de *Cochiospermum regium* Mart. (algaõzinho-do-campo) em camundongos. Rev. Bras. OL. Méd., Botucatu. 6(3):15-19.

CHEN, W.; WENG, Y. M.; TSENG, C. Y. 2003. Antioxidative and Antimutagenic Activities of Healthy Herbal Drinks from Chinese Medical Herbs. *The American Journal Of Chinese Medicine.*, 31(4): 523-32.

CHIQUETTI-JUNIOR, A.; RODRIGUES, M. A. F.; ALVARES, D. V. D. 2007. An experimental model for the study of drug effects on cutaneous healing. *Acta Cir. Bras.* 22(4):.317-321.

CHUNG, H.W.; KANG, S.J.; KIM, S.Y.A. 2002. A combination of the micronucleus assay and a FISH technique for evaluation of the genotoxicity of 1,2,4-benzenetriol. *Mutation Research*, 516:49-56.

CLARK. R. A. F. 1993. Biology of dermal wound repair dermatological clinics. *Invest. Dermatol.*, 11: 647-661.

CLARK. R. A. F. 1996. The molecular and Cellular biology of wound repair. 2nd ed. New York: Plenum Press, Cap. 6:195-240.

COOK, P.R., AND BRAZELL, I.A. 1977. Supercoils in nuclear DNA and the repair of radiation damage. *Mut. Res.* 46, 111-112.

DESHMUKHA, P. T; FERNANDESB, J.; AKARTE ATUL, A.; & TOPPOA, E. 2009. Wound healing activity of *Calotropis gigantea* root bark in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 125: 178–181

DING, G.R.; NAKAHARA, T.; MIYAKOSHI, J. 2003. Induction of kinetochore-positive and kinetochore-negative micronuclei in CHO cells by ELF magnetic fields and/or X-rays. *Mutagenesis*, 18(5):439-443.

DONÀ, M.; DELL'AICA, I.; CALABRESE, F.; BENELLI, R.; MORINI, M.; ALBINI, A. AND GARBISA, S., 2003. Neutrophil Restraint by Green Tea: Inhibition of Inflammation, Associated Angiogenesis, and Pulmonary Fibrosis *J. Immunol.*; 170: 4335-4341.

DOUKAS, C.N.; MAGLOGIANNIS, I.; CHATZIOANNOU, A.; LOUTRARI, H. 2006a. A Computer Based Tool for Tumor Growth and Inhibition Detection using Angiogenesis Quantification. [periódico na Internet]. [citado Nov 2007]; Disponível em: <http://medlab.cs.uoi.gr/itab2006/proceedings/Medical%20Imaging/77.pdf>.

DOUKAS, C. N.; MAGLOGIANNIS, I.; CHATZIOANNOU, A.; PAPAPETROPOULOS, A. 2006b. Automated Angiogenesis Quantification through advanced Image Processing Techniques.. [Engineering in Medicine and Biology Society, EMBS Annual International Conference of the IEEE](#). New York City,USA, p. 2345-2348.

DUSINSKA, M.; COLLINS, A. R. 2008. The comet assay in human biomonitoring: gene–environment interactions. *Mutagenesis*, 23, 191–205.

DVORAK, H. F. 2002. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol.* 20(21): 4638-80.

DVORAK, H. F. 2005. Angiogenesis: Update. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, Vol.3 (8) p 1835-1842.

ELLEGREN, H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature - Reviews Genetics*. 5: 435-445.

EMING, S.A.; KRIEG, T. and DAVIDSON, J. M. 2007. Inflammation in Wound Repair: Molecular and Cellular Mechanisms. *Journal of Investigative Dermatology* 127, 514–525

ERIKSSON, S.; NYGREN, J.; AHNSTRO, G. 2002. Matrix association of early- and late-replicating chromatin studied by single-cell electrophoresis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 1590 (1-3): 103-108

FALCK, G.C.M.; CATALÁN, J.; NORPPA, H. 2003. Nature of anaphase laggards and micronuclei in female cytokinesis-blocked lymphocytes. *Mutagenesis* 18(2):111-117

FARNSWORTH, N.R.; AKERELE, O.; BINGEL, A.S.; SOEJARTO, D.D.; GUO, Z. 1985. Medicinal plants in therapy. *Bulletin of the WHO*, 63(6): 965-81.

FERRARA, N. 2004. Vascular Endothelial Growth Factor: Basic Science and Clinical Progress. *Endocrine Review*. 25(4):581-611.

FERRARA, N. & HENZEL, W.J. 1989. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 161(2):851-8.

FOLKMAN J. 1971. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *New England Journal of Medicine.* 285:1182-1186.

FOLKMAN, J. 1972. Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Ann Surg.* 175:400-408.

FOLKMAN, J. . 1976. The Vascularization of Tumors. *Sci Am.* 234(5): 58-64.

FOLKMAN, J. 2004. A novel anti-vascular therapy for cancer. *Cancer Biol Ther.* 3(3): 338-9

FOLKMAN, J.; INGBER, D. E. 1987. Angiostatic Steroids. *Ann. Surg.* 206 (3): 374-382.

FOLKMAN, J. & SHING, T. 1992. Angiogenesis, *J. Biol. Chem,* 267, 10931-34

GAUTHIER, J. M.; DUBEAU, H.; RASSART, É.; JARMAN W. M.; WELLS, R. S. 1999. Biomarkers of DNA damage in marine mammals. *Mutation Research,* 444: 427-439.

GONZALEZ, R. P.; LEYVA, A. M.; RAMON, A. B.; MOREIRA, R.D.M.; PESSOA, C.; FARIAS, R.F.; MORAES, M.O. 2000. Método para o estudo in vivo da angiogênese: indução de neovascularização na córnea de coelho. *Acta Cir. Bras.* 15(3) [citado 15 maio 2008], p.00-00. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-865020000003000006&lng=pt&nrm=iso

GOVINDAPPA, T.; GOVARDHAN, L.; JYOTHY, PS.; VEERABHADRAPPA, P.S. 1987. Purification and characterisation of acetylcholinesterase isozymes from the latex of *Synadenium grantii* Hook, 'f. *Indian J. Biochem. Biophys.*, vol. 24, no. 4, p. 209-217.

GOUGH, N. R. 2007. Excessive Angiogenesis Inhibits Tumor Growth. *Sci. STKE* , 2007(367): tw3

GROSSO, G. S. La familia euforbiaceae como condición promisoría para la obtención de metabolitos secundarios. [citado em 20 de outubro de 2004]. Disponível na World Wide Web <www.ut.edu.co/fc/0940/gsg/euforbiaceae.pdf>

HARD, G.C. 1998. Mechanisms of chemically induced renal carcinogenesis in the laboratory rodent. *Mutag. Res.*, 239:104-112.

HARDING, K.G.; MORRIS, H.L.; PATEL, G.K. 2002. Science, medicine, and the future: Healing chronic wounds. *BMJ.* 324:160-163.

HEDDLE, J. A. 1973. A rapid *in vivo* test for chromosomal damage. *Mutation Research*, 18: 187-190

HIRAMATSU, N; XIUFEN, W; TAKECHI, R.; ITOH, Y.; MAMO, J; Pal, S. 2004. Antimutagenicity of Japanese traditional herbs, gennoshoko, yomogi, senburi and iwato tobacco BioFactors. 22: 123–125.

JÄGER, AK., HUTCHINGS, A. and VAN STADEN, J., 1996. Screening of Zulu medicinal plants for prostaglandin-synthesis inhibitors *J. Ethnopharmacol.*, vol. 52, no. 2, p. 95-100.

JASSBI, A.R., 2006. Chemistry and biological activity of secondary metabolites in *Euphorbia* from Iran. *Phytochemistry*, 67 (18), 1977–1984.

JONES, P.H.; CHRISTODOULOS, K.; DOBBS, N.; THAVASU, P.; BALKWILL, F.; BLANN, A.D.; CAINE, G.J.; KUMAR, S.; KAKKAR, A.J.; GOMPERTZ, N.; TALBOT, D.C.; GANESAN, T.S.; HARRIS, A.L. 2004. Combination antiangiogenesis therapy with marimastat, captopril and fragmin in patients with advanced cancer. *British Journal of Cancer*. 5:(1):30-36.

KADA, T.; MORITA, K.; INOUE, T. 1978. Anti-mutagenic action of vegetable factor(s) on the mutagenic principle of tryptophan pyrolysate. *Mutation Research*, Amsterdam, 53: 351-353.

KARAKAYA, S.; KAVAS, A. 1999. Antimutagenic activities of some foods. *J Sci Food Agric*. 79:237-242.

KAWASHIMA, M.; NUMAZAWA, K.; KATO, N.; TOKUNAGA, K.; EBISAWA T. 2006. Establishment of the method for 'comprehensive clock gene scan' using microsatellite markers. *Annual Report of the Pharmacopsychiatry Research Foundation*. 38: 250-256

KHAN, T.H.; PRASAD, L.; SULTANA, A.; SULTANA, S. 2005. Soy isoflavones inhibits the genotoxicity of benzo(a)pyrene in Swiss albino mice. *Human & Experimental Toxicology*, 24:149-155.

KINGHORN, A.B. 1980. Major skin-irritant principle from *Synadenium grantii*. *J Pharm Sci.*,69(12):1446-1447.

KUPCHAN, S.M.; UCHIDA, I.; BRANFMAN, A.R.; DAILEY, R.G.; FEI, B.Y. 1976. Antileukemic principles isolated from euphorbiaceae plants. *Science*, 191(4227): .571-572.

KÜPPER, C. BURKE, SZÉKELY, T.; DAWSON, D. A. 2008. Enhanced cross-species utility of conserved microsatellite markers in shorebirds. *BMC Genomics*, 9 (502): 1-20.

LAPA, A.J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M. T.; GODINHO, R. O.; NOGUEIRA, T. C. M. L. 2004. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.M.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R., orgs. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 2.ed. Porto Alegre: UFRGS, cap.10, p.229-245.

LI, J; ZHANG, Y.P.; KIRSNER, R.S. 2003. Angiogenesis in wound repair: angiogenic growth factors and the extracellular matrix. *Microsc. Res. Tech.* 60(1). 107-14.

LI, J.; FOITZIK, K.; CALAUTTI, E.; BADEN, H.; DOETSCHMAN, T.; DOTTO, G. P. 1999. TGF-beta3, but not TGF-beta1, protects keratinocytes against 12-O-

tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced cell death in vitro and in vivo. J. Biol. Chem. 274: 4213-19.

LOEB, L. 1919. A COMPARATIVE STUDY OF THE MECHANISM OF WOUND HEALING. Journal Medical Research, 247-281.

LLORENTE' M.T.; MARTOS, A.; CASTAÑO, A. 2002. Detection of Cytogenetic Alterations and Blood Cell Changes in Natural Populations of Carp. Ecotoxicology, 11(1): 27-34.

MARON, D. M.; AMES, B. N., 1983, Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. Mutation Research, 113: 173-215.

MALINS, D.C.; HELLSTRÖM, K.E.; ANDERSON,K.M.; JOHNSON, P.M.; VINSON, M.A. 2002. Antioxidant-induced changes in oxidized DNA. PNAS, 99(9):5937-5941.

MAY, AE.; SEIZER, P. AND GAWAZ, M. 2008. Platelets: Inflammatory Firebugs of vascular walls. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 28: 5-10.

MENDONÇA, R. J. 2004. Caracterização biológica de uma fração angiogênica do látex natural da seringueira – *Hevea brasiliensis*. Tese de Mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP.

MITSCHER, L.A., DRAKE, S., GOLLAPUDI, S.R., OKWUTE, S.K. 1987. A modern look at folkloric use of anti-infective agents. Journal of Natural Products, 50:1025-1040

MOUSTACCHI, E. 2000. DNA damage and repair: consequences on dose-responses. *Mutat. Res.*, 464:35-40

MOZAFFARIEH, M.; SCHOETZAU, A.; SAUTER, M.; GRIESHABER, M.; ORGÜL, S.; GOLUBNITSCHAJA, O.; FLAMMER, J. 2008. Comet assay analysis of single-stranded DNA breaks in circulating leukocytes of glaucoma patients. *Mol Vis.*, 14: 1584–1588

MRUÉ, F. 1997. Substituição do Esôfago Cervical por Prótese Biossintética de Látex - Estudo Experimental em Cães. Tese de Mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP.

MRUÉ, F. 2000. Neoformação tecidual induzida por biomembrana de látex natural com polilisina. Aplicabilidade em neoformação esofágica e da parede abdominal. Estudo experimental em cães. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP.

MUSTOE, T. A.; PIERCE, G. F.; MORISHIMA, C.; DEUEL, T. F. J. 1991. *Clin Invest.* 87: 694-703.

NAGAI, M.K. & EMBIL, J.M. 2002. Becaplermin: recombinant platelet derived growth factor, a new treatment for healing diabetic foot ulcers. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 2(2): 211-218.

NAYAK, B. S.; ISITOR, G.; DAVIS, E. M.; PILLAI, G. K. 2007. The evidence based Wound Healing activity of *Lawsonia inermis* Linn. *Phytother. Res.* 21:827-831

NAYAK, B.S.; PEREIRA, L. M. P. 2006. *Catharanthus roseus* flower extract has wound-healing activity in Sprague Dawley rats. BMC Complementary and Alternative Medicine. 6(41): 1-6.

NIESSEN, F.B.; ANDRIESSEN, MP; SCHALKWIJK, J; VISSER, L; TIMENS, W. 2001. Keratinocyte-derived growth factors play a role in the formation of hypertrophic scars. J. Pathol. 194(2): 207-216.

NOGUEIRA, I.A.L.; LEÃO, A.B.B.; VIEIRA, M.S.; BENFICA, P.L.; CUNHA, L.C.; VALADARES, M.C. 2008. Antitumoral and antiangiogenic activity of *Synadenium umbellatum* Pax. J. Ethnopharmacol., 120 (3): 474-478.

NORPPA, H. & FALCK, G.C.M. 2003. What do human micronuclei contain. Mutagenesis, 18(3):221–233.

OLIVEIRA, E. J.; DANTAS, J. L. L.; CASTELLEN, M. S.; MACHADO, M. D. 2008. Identification of microsatellites for papaya by DNA data bank exploration. Rev. Bras. Frutic. 30 (3): 841-845 .

OLIVEIRA, J.A. A.; HYPPOLITO, M. A., COUTINHO-NETTO, J. *et al.* 2003. Miringoplastia com a utilização de um novo material biossintético. Rev. Bras. Otorrinolaringol., 69(5):.649-655.

OLIVEIRA, R.B.; CUNHA, L.C.; VALADARES, M.C.; PERES FILHO, M.J.; ARAÚJO, D.M.; PAULA, J.R.; BASTOS, M.A., 2005. Toxicidade aguda de látex e extrato

etanólico de folhas de *Synadenium umbellatum* em camundongos. Rev. Eletr. Farm. 2 (2), 143–145.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. 2004. 134^a Sessão do Comitê Executivo.Tema 4.4. Washington, D.C., EUA. citado em 10 de abril de 2005]. Disponível na World Wide Web <http://www.paho.org/Portuguese/GOV/CE/ce134-12-p.pdf>

ORTENCIO, B. 1997. Medicina Popular do Centro-Oeste. 2^a ed. 459p. Thesaurus. Brasília,

PEREIRA, C. A. B. 1992. Plantas tóxicas e Introdução na veterinária. Editora UFG-Go.

PESIN, I.; KOCA, U.; KELES, H.; AKKOL, E. K. 2009. Wound Healing Activity of *Rubus sanctus* Schreber (Rosaceae): Preclinical Study in Animal Models. eCAM: 1-7

PINTO, L. F. R.; FELZENSZWALB, I. 2003. Genética do Câncer Humano. In: Ribeiro, L. R.; Saldori, D. M. F.; Marques, E. K. Mutagênese Ambiental. Canoas: ULBRA, cap. 2. p. 29-48.

RATES, S.M.K. 2001. Plants as source of drugs. Toxicon, Amsterdam, 39: 603-613.

RAJESH, R.; A. NATARAJU, A.; GOWDA, C.D.R.; FREY, B.M.; FREY, F.J.; VISHWANATH, L. B.S. 2006. Purification and characterization of a 34-kDa, heat

stable glycoprotein from *Synadenium grantii* latex: action on human fibrinogen and fibrin clot. *Biochimie* 88(10):1313-1322.

RIBATTI, R., VACCA, A., RONCALI, L. & DAMMACCO, F. 1996. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for *in vivo* Research on angiogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* 40: 1189-1197.

RIBEIRO, L.R. 2003. Teste do micronúcleo em medulla óssea de roedores *in vivo*. In: *Mutagênese Ambiental* (Ribeiro LR, Salvadori). Editora ULBRA, p. 173-200.

RISAU, W. Mechanisms of angiogenesis.1997. *Nature*. 386:671-74.

ROBERTS, A.B. 1998. Molecular and cell biology of TGF-beta. *Miner. Electrolyte Metab.* 24(2-3):111-119.

ROBERTS, A.B. & SPORN, M.B. 1996. Transforming growth factor- β . In: CLARK, RAF. *The molecular and cellular biology of wound repair*. 2 ed. N.Y., Plenum Press, p.275-308.

ROSEFORT, C.; FAUTH, E.; ZANKL, H. 2004. Micronuclei induced by aneugens and clastogens in mononucleate and binucleate cells using the cytokinesis block assay. *Mutagenesis*, 19 (4): 277-284,

ROY, .M.; CHAKRABARTY, S.; SINHA, D.; BHATTACHARYA, R. K.; SIDDIQI, M. 2003. Anticlastogenic, antigenotoxic and apoptotic activity of epigallocatechin gallate: a green tea polyphenol. *Mutation Research*, 523-524: 33-41.

SADER, S. L.; COUTINHO-NETTO, J.; BARBIERI-NETO, J.; MAZZETTO, S. A.; ALVES-JR., P.; VANNI, J. C.; SADER, A. A. 2000. Substituição parcial do pericárdio de cães por membrana de látex natural. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 15(4): 338-344.

SALATINO, A.; FARIA-SALATINO, M. L.; NEGRI, G. 2007. Traditional uses, Chemistry and Pharmacology of *Cronton* species (Euphorbiaceae). *J. Braz. Chem. Soc.*, 18(1):11-33.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P.R. 2004. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.M.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R., orgs. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 2.ed. Porto Alegre: UFRGS, cap.15, p.291-320.

SCHMID, W. 1975. The micronucleus test. *Mutat Res.* 31(1):9-15.

SINGER, A. J; CLARK, R. A. 1999. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med.* 341:738-746.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. 1988. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Experim Cell Res.* 175:184-191.

SIMPSON, D.M.; ROSS, R. 1972. The neutrophilic leukocyte in wound repair a study with anti-neutrophil serum. *J Clin Invest* 51: 2009–2023

SPEIT, G.; VASQUEZ, M.; HARTMANN, A. 2009. The Comet Assay as an indicator Test for Germ Cell. Genotoxicity. Mutation Research; 681(1):3-12.

TICE RR. 1995. The single cell gel/comet assay: A microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. In: Phillips DH, Venitt S, editors. Environmental mutagenesis. Oxford: Bios Scientific Publishers. 315–339.

TONNESEN, M.G.; FENG, X.; CLARK, R. A. F. 2000. Angiogenesis in Wound Healing. Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings, 5: 40–46

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. 2006. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* 42(2):289-306.

VALADARES, MC., CASTRO, NC. DE, CUNHA, LC. DA, 2007. *Synadenium umbellatum*: citotoxicidade e danos ao DNA de células da medula óssea de camundongos. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, 43 (4): 631-638.

VALVERDE, M.; ROJAS, E. 2009. Environmental and occupational biomonitoring using the Comet assay. Mutation Research, 681(1): 93-109

VARGAS, A.; ZEISSER-LABOUÈBE, M.; LANGE, N. GURNY, R.; DELIE, F. 2007. The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the *in vivo* evaluation of drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59: 1162-1176.

VEIGA-JUNIOR, V.F. 2008. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. *Rev. bras. farmacogn.*, 18(2):308-313.

VIJG, J. 2000. Somatic mutations and aging: a re-evaluation; *Mut. Res.*, 447(1):117-135.

YUNES, R.A. & CALIXTO, J. B. 2001. Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. 500 p. Editora Argos.

WANG, S.; ZHENG, Z.; WENG, Y.; YU, Y.; ZHANG, D.; FAN, W.; DAI R, H. U. Z. 2004. Angiogenesis and anti-angiogenesis activity of Chinese medicinal herbal extracts. *Life Sci.* 74(20):2467-2478.

WATERS, M.D.; STACK, H.F.; JACKSON, M.A.; BROCKMAN, H.E.; FLORA, S. 1996. Activity profiles of antimutagens: in vitro and in vivo data. *Mutat Res.* 350(1): 109-129.

WERNER, S.; GROSE, R. 2003. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol. Rev.* 83(3), 835-70.

WILTING, J.; CHRIST, B.; WEICH, H. A. 1992. The effects of growth factors on the day 13 chorioallantoic membrane (CAM): a study of VEGF₁₆₅ and PDGF-BB. *Anat Embryol.* 186:251-257.

www.epa.gov ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA) (2001). Health effects test guidelines – OPPTS 870.5395. Mammalian erythrocyte micronucleus test. Accessed on: 24/01/2008

ZIJLSTRA, A.; SEANDEL, M.; KUPRIYANOVA, T.A.; PARTRIDGE, J.J.; MADSEN, M.A.; HAHN-DANTONA, E.A.; QUIGLEY, J.P. & DERYUGINA, E.I. 2006. Proangiogenic role of neutrophil-like inflammatory heterophils during neovascularization induced by growth factors and human tumor cells. *Blood*, 107(1): 317-327.

ZWADLO-KLARWASSER, G.; GÖRLITZ, K.; HAFEMANN, B.; KLEE, D. & KLOSTERHALFEN, B. 2001. The chorioallantoic membrane of the chick embryo as a simple model for the study of angiogenic and inflammatory response to biomaterials. *Journal of materials science: Materials in Medicine*. 12:195-199.

Capítulo 1

1º Manuscrito

Em avaliação para publicação na Revista Food and Chemical Toxicology

Assessment of the mutagenic and antimutagenic activity of *Synadenium umbellatum* Pax latex by micronucleus test in mice

P.R. Melo-Reis, L.S.A. Bezerra, M.A.A.B. Vale, R.F.R. Canhête, L. Chen-Chen¹

Laboratório de Radiobiologia e Mutagênese, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás (UFG), Campus-II, 74001-970, Goiânia-GO, Brazil

Running title: Biological action of *S. umbellatum* latex

Keywords: *S. umbellatum* latex, mutagenicity, antimutagenicity, cytotoxicity, micronucleus, mice.

Abbreviations: bw: body weight; ip: intraperitoneal injection; MMC: mitomycin C; MNPCE: micronucleated polychromatic erythrocytes; NCE: normochromatic erythrocytes; PCE: polychromatic erythrocytes; SuL: *Synadenium umbellatum* latex

¹ Corresponding author. Tel.: +55 62 3521 1483; fax: +55 62 3521 1190.

E-mail address: chenleego@yahoo.com.br (L. Chen-Chen).

ABSTRACT

Synadenium umbellatum Pax, popularly known as “cola-nota”, is a medicinal plant that grows in tropical regions. The latex of this plant is used against various diseases, such as diabetes mellitus, leprosy, tripanosomiasis, leukemia, and several malignant tumors. The mutagenic, antimutagenic, and cytotoxic effects of the latex of this plant species were investigated by measuring the frequency of micronuclei in mice bone marrow cells. To evaluate mutagenicity, the animals were treated with four doses of latex (10, 30, 50, and 100 mg/kg body weight). To study the antimutagenic activity, the animals were simultaneously treated with latex and mitomycin C (4 mg/kg). The cytotoxicity was evaluated by polychromatic and normochromatic erythrocytes ratio. Our results showed an increased frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) ($P < 0.05$). Concerning antimutagenicity, the doses of 10 and 30 mg/kg co-administered with mitomycin C showed significant decrease in MNPCE frequency compared to the positive control group ($P < 0.05$). However, no significant reduction in MNPCE frequency ($P > 0.05$) was detected at the doses of 50 and 100 mg/kg. Under our experimental conditions, the results obtained indicate strong mutagenic and cytotoxic activity of *S. umbellatum* latex and moderate antimutagenic effect at lower doses.

1. Introduction

Brazilian traditional or folk medicine has long been making use of plants and plant-derived drugs or phytomedicines to treat a wide range of health problems. In

conformity with this common knowledge, some plants have demonstrated interesting properties, such as *Annona crassiflora* Mart. (Vilar et al., 2008), *Solanum lycocarpum* St. Hil. (Costa et al., 2005), *Phaseolus vulgaris* (Ribeiro and Salvatori, 2003), and *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Andrade et al., 2006), since they were able to reduce the incidence of DNA damage. Nevertheless, herbal medicines can be potentially toxic to human health. Recent investigations have revealed that many plants used in folk medicine are potentially genotoxic, such as *Cochlospermum regium* (Schränk) Pilg. (Castro et al., 2004; Andrade et al., 2008), *Ocotea duckei* Vatt. (Marques et al., 2003), *Copaifera langsdorfii* Desfon (Chen-Chen and Sena, 2002), *Paullinia cupana* Kunth (Fonseca et al., 1994), and the authors suggest that their use must be well established.

Even among antimutagen compounds, great care should be taken because a number of substances reported to be antimutagens or anticarcinogens have been shown to be mutagenic or carcinogenic themselves (Zeiger, 2003). Due to this, it is extremely important to test the genotoxicity of these preparations in order to assess their mutagenic potential or genotoxicity modulation when associated with other substances (Silva et al., 1995; Di Stasi et al., 2002). Plants are known to contain innumerable biologically active compounds, and although they present pharmacological properties, they may also cause harm, including damage to DNA (Alade and Irobi, 1993; Marques et al., 2003). Thus, the investigation of traditionally used medicinal plants is valuable for two main reasons: first, to use them as sources of potential chemotherapeutic drugs; and second, as a measure of safety of continuous use of medicinal plants (Verschaeve et al., 2004).

Synadenium umbellatum Pax (Euphorbiaceae) (synonyms: *Euphorbia umbellata* and *Synadenium grantii* Hook), popularly known as “cola-nota”, “avelós”,

“milagrosa”, and “cancerola”, is a medicinal plant that grows in tropical regions, both in the American and African continents. The latex of this plant is used against various diseases such as diabetes mellitus, Hansen’s disease, tripanosomiasis, leukemia, and several malignant tumors (Ortêncio, 1997).

The mutagenic, cytotoxic, toxic, antitumoral, and antiangiogenic action of the leaves of this plant have already been identified (Nogueira et al., 2008; Oliveira et al., 2005; Reis et al., in press; Valadares et al., 2007). In folk medicine, the latex of plants belonging to the genus *Synadenium* has been considered caustic and toxic. Several studies have shown the presence of toxic substances and proteolytic enzymes in the latex of this plant species (Govindappa et al., 1987; Jäger et al., 1996; Menon et al., 2002). Other species of this genus also demonstrated anti-inflammatory activity (Jäger et al., 1996).

Due to the large utilization of plant latex as well as the relevant pharmacological activities of this substance already described, the goal of the present work was to evaluate the possible mutagenicity and/or antimutagenicity of *S. umbellatum* latex (SuL) using micronucleus test.

2. Materials and methods

2.1 Synadenium umbellatum latex (SuL)

SuL was collected in Goiânia (16°37'40.94"S and 49°16'13.41"W), state of Goiás, Midwestern Region of Brazil, in November 2007. A voucher specimen was

deposited at the Herbarium of the Universidade Federal de Goiás under the number 40.006/UFG. We extracted the sap through incisions in the trunk, at the height of 100 cm (3.28 feet) in relation to the soil. The secretory cells drained and 1.0 mL of this latex was collected directly in a sterile plastic syringe and immediately transferred to a sterile glass container with 9 mL of sterile distilled water. This material was stocked at 4°C and used within 30 days (Mendonça, 2004; Mrué, 1997). The density of the pure latex was 1 g/mL and it was diluted with distilled water just before use.

Phytochemical studies of members of the family Euphorbiaceae revealed the presence of flavonoids, saponins, diterpenes, and phorbol esters (Bagalkotkar et al., 2006; Jassbi, 2006). Also, phorbol esters (Kingham, 1980), lectins (Premaratna et al., 1981), glycoproteins (Rajesh et al., 2006), diterpene esters (Bagavathi et al., 1988), and triterpenoids (Uzabakiliho et al., 1987) were identified in SuL and have been proven to be associated with its pharmacological properties.

2.2 Animals

The experimental protocol (CEPMHA/HC/UFG no. 037/2008) was approved by the Human and Animal Research Ethics Committee of the Universidade Federal de Goiás. Male Swiss albino (*Mus musculus*) mice (8-12 week-old) weighing 35 ± 10 g were obtained from the Central Animal House of the Universidade Federal de Goiás and kept in polyethylene cages (40 cm x 30 cm x 16 cm) with husk bedding, in an air-conditioned room ($24 \pm 2^\circ\text{C}$; $55 \pm 5\%$ relative humidity), with a 12-h light-dark

cycle, and free access to drinking water and food (appropriate commercial rodent diet Labina, Ecibra Ltda).

2.3 Chemicals and drugs

Mitomycin C (MMC), acquired from Bristol-Myers Squibb, was used in the evaluation of antimutagenicity of the plant latex. Giemsa was obtained from Doles Reagentes e Equipamentos para Laboratórios in Goiânia. Methanol was obtained from Labsynth Produtos para Laboratórios and fetal calf serum from Laborclin Produtos para Laboratórios. Dibasic sodium phosphate and monobasic sodium phosphate were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Company.

2.4 Experimental design

To assess SuL mutagenicity, doses of 10, 30, 50, and 100 mg/kg body weight (bw) were administered by intraperitoneal injection (ip) to groups of five animals for each treatment. A positive control (MMC) (4 mg/kg bw) and a negative control (distilled sterilized water) were also included. Mice were euthanized by cervical dislocation 24 h after SuL administration.

To evaluate antimutagenicity, four animal groups of five animals each were co-treated by ip with 10, 30, 50, and 100 mg/kg bw of SuL and 4 mg/kg bw of MMC and

euthanized by cervical dislocation 24 h after treatment. We used the same positive control (MMC) and negative control (H₂O) groups employed in the mutagenicity evaluation.

For both experiments, after the period of treatment (24 h), mice femurs were dissected, opened, the bone marrow was gently flushed out with fetal calf serum, and centrifuged (300 g, 5 min). The bone marrow cells were smeared on glass slides, coded for blind analysis, air-dried, and fixed with absolute methanol for 5 min. To detect MNPCE frequency, we fixed the smears with Giemsa (Heddle, 1973), prepared two slides for each mouse, and scored 1000 polychromatic erythrocytes (PCE) per slide. The results were the average of two slides. To determine the cytotoxic activity, we simultaneously computed 1000 normochromatic erythrocytes and the polychromatic erythrocytes frequency.

2.5 Statistical analysis

In order to analyze the mutagenic activity of SuL, we compared the MNPCE frequencies obtained for the treated groups and the negative control group using one way analysis of variance (ANOVA), followed by all pairwise comparisons via a

multiple comparison procedure (Tukey test). P-values lower than 0.05 ($P < 0.05$) were considered indicative of statistical significance.

To analyze SuL antimutagenicity, we compared MNPCE frequencies observed in the treated groups and the positive control group by F-test (ANOVA) followed by Tukey test. P values lower than 0.05 ($P < 0.05$) were considered indicative of statistical significance.

To evaluate the cytotoxicity of SuL, the polychromatic erythrocytes/normochromatic erythrocytes ratio (PCE/NCE) of all treated groups was compared to the result obtained in the mutagenic effect evaluation for the negative control group, and the results found in the antimutagenic effect evaluation for the positive control, using qui-square test (χ^2). P values lower than 0.05 ($P < 0.05$) were considered indicative of statistical significance.

3. Results

The results obtained for mice treated with different concentrations of SuL as well as SuL in combination with MMC are shown in Table 1. No significant difference in the frequency of MNPCE was observed between mice treated with 10 mg/kg of SuL and the negative control ($P > 0.05$). A high increase in the frequency of MNPCE was detected in mice treated with 30, 50, and 100 mg/kg of SuL compared to the negative control ($P < 0.05$). Also, no significant difference was observed in MNPCE

induction between the group treated with 100 mg/kg of SuL and the positive control ($P > 0.05$).

Simultaneous treatments with different concentrations of SuL and MMC led to reduction in the frequency of MNPCE compared to MMC alone, which was only significant for the treatments using 10 and 30 mg/kg of SuL with the addition of MMC ($P < 0.05$), corresponding to decreases of 71.8% and 62.8% in the frequency of MNPCE, respectively. By contrast, no significant reduction was observed for the treatments combining higher concentrations of SuL (50 and 100 mg/kg) and MMC. These results indicate lack of a dose-response correlation, since the lowest concentration of SuL was found to be effective and a gradual increase in concentration did not result in a proportional increase in the reduction of mutagenicity.

No significant differences in the PCE/NCE ratio were observed when comparing mice treated with 10 mg/kg of SuL and the respective negative control ($P > 0.05$), whereas a significant reduction in this ratio was found in mice treated with 30, 50, and 100 mg/kg of SuL, indicating that these doses were cytotoxic to mice bone marrow ($P < 0.05$), as shown in Table 1. Also no significant difference was detected between the PCE/NCE ratio obtained for mice treated with 30, 50, and 100 mg/kg of SuL with the addition of MMC and those treated with SuL or MMC alone ($P > 0.05$). Nonetheless, a significant increase in the PCE/NCE ratio was observed in mice treated simultaneously with 10 mg/kg of SuL and MMC compared to those treated with MMC alone ($P < 0.05$).

4. Discussion

The present results show that the higher concentrations of SuL used (30, 50, and 100 mg/kg) provoked a mutagenic effect on erythroblasts in the bone marrow. We also detected a dose-response relation among concentration of SuL, mutagenicity, and cytotoxicity. Increased SuL concentrations resulted in increased MNPCE and reduced PCE/NCE ratios. This fact might be explained, at least partially, by the mutagenic action of SuL that resulted in cell death.

Sartorelli et al. (1989) reported that the oxygen free radicals generated by some chemicals cause cytotoxicity. The relative cytotoxicity inherent in these processes is contingent on the extent of DNA damage induced by the given drug and on the ability of the cell to repair DNA damage; yet, cells have great difficulty to repair damage caused by DNA-protein cross-linking drugs. Loss of both the DNA integrity and its template action as a consequence of binding result in the inhibition of DNA replication; in turn, cell division is blocked, transcription is inhibited, and the resulting loss of RNA and subsequent protein synthesis culminate ultimately in cell death (Balis, 1968).

Valadares et al. (2007) demonstrated the mutagenic activity of *S. umbellatum* leaf extract using the micronucleus test in mice, in which the extract increased the frequency of MNPCE when compared to the negative control group. The authors also showed a dose-response relation, although not proportional to increase in dose.

On the other hand, in the present work, a simultaneous treatment with the lowest concentrations of SuL (10 and 30 mg/kg) and MMC revealed a protective effect against chromosome damage induced by MMC. The antimutagenic effect of SuL observed in our study might be attributed to its action to reduce alkylation and also to its antioxidant activity, since the genotoxic action of MMC is related to its ability to alkylate DNA and produce reactive free radicals, which causes different types of cellular damage, including DNA breaks. Studies have shown that the 2-amino group of guanine is the site of alkylation (Kang et al., 2006). Thus, SuL action might be related to the protection of the nucleophilic site in DNA.

In this study, we observed an increase in the PCE/NCE ratio compared to the positive control (MMC) at the dose of 10 mg/kg co-treated with MMC. This fact indicated that the lowest concentration of SuL with the addition of MMC reduced the cytotoxic effect of the latter. No difference in the PCE/NCE ratio was observed among the doses of 30, 50, and 100 mg/kg of SuL with the addition of MMC and MMC alone. It has already been reported that the association of MMC with other antitumoral agents cause an increase in their cytotoxic effect due to an increase in apoptosis induction (Estrem and Vanleeuwen, 2000; Kraut and Drnovsek-Olup, 1996), but in our study, this was not detected. By contrast, we observed that there was no increase in cytotoxicity when using SuL co-administered with MMC, which might be explained by a simultaneous mutagenic and antimutagenic action of SuL at the concentrations of 30, 50 and 100 mg/kg.

In conclusion, the present results indicate that SuL should be used with caution since high doses of this compound can be genotoxic by themselves. These

data contribute to better understand the mechanisms of action of SuL and, consequently, to its safer and more effective application in human health.

5. Acknowledgements

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG).

6. References

- Alade, P.I., Irobi, O.N., 1993. Antimicrobial activities of crude leaf extracts of *Acalypha wilkesiana*. J. Ethnopharmacol. 39 (3), 171–174.
- Andrade, L.S., Castro, D.B., Chen-Chen, L., 2006. Efeito modulador do extrato de *Stryphnodendron adstringens* Mart. (barbatimão) contra danos induzidos pela mitomicina C em camundongos. J. Braz. Soc. Ecotoxicol. 1 (2), 127–130.
- Andrade, L.S., Santos D.B., Castro, D.B., Guillo, L.A., Chen-Chen, L., 2008. Absence of antimutagenicity of *Cochlospermum regium* (Mart. and Schr.) Pilger by micronucleus test in mice. Braz. J. Biol. 68 (1), 155–159.
- Bagalkotkar, G., Sagineedu, S.R., Saad, M.S., Stanslas, J., 2006. Phytochemicals from *Phyllanthus niruri* Linn. and their pharmacological properties: a review. J. Pharm. Pharmacol. 58 (12), 1559–1570.

- Bagavathi, R., Sorg, B., Hecker, E., 1988. Tiglane-type diterpene esters from *Synadenium grantii*. *Planta Med.*, 54 (6), 506–510.
- Balis, M.E., 1968. Seminars on Lesch-Nyhan syndrome. Aspects of purine metabolism. *Fed. Proc.* 27 (4), 1067–1074.
- Castro, D.B., Santos, D.B., Ferreira, H.D., Santos, S.C., Chen-Chen, L., 2004. Atividade mutagênica e citotóxica do extrato de *Cochlospermum regium* Mart. (algodãozinho-do-campo) em camundongos. *Rev. Bras. Plantas Med.* 6 (3), 15–19.
- Chen-Chen, L., Sena, M.A., 2002. Atividade tóxica e mutagênica do óleo de copaíba (*Copaifera langsdorfii* Desfon) em camundongos. *Rev. Bras. Plantas Med.* 5 (1), 37–40.
- Costa, P.M. da, Ferreira, H.D., Ferri, P.H., Santos, S.C., Guillo, L.A. Chen-Chen, L., 2005. Ação moduladora da genotoxicidade da *Solanum lycocarpum* St Hil. em micronúcleos induzidos pela ciclofosfamida. *Rev. Biol. Neotrop.* 2 (1), 43–48.
- Di Stasi, L.C., Oliveira, G.P., Carvalhaes, M.A., Queiroz Júnior, M., Tien, O.S., Kakinami, S.H., Reis, M.S., 2002. Medicinal plants popularly used in the Brazilian tropical Atlantic Forest. *Fitoterapia* 73 (1), 69–91.
- Estrem, S.A., Vanleeuwen, R.N., 2000. Use of mitomycin-C for maintaining myringotomy patency. *Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 122 (1), 8–10.
- Fonseca, C.A., Leal, J., Costa, S.S., Leitão, A.C., 1994. Genotoxic and mutagenic effects of guaraná (*Paullinia cupana*) in prokaryotic organisms. *Mutat. Res.* 321 (3), 165–173.
- Govindappa, T., Govardhan, L., Jyothy, P.S., Veerabhadrapa, P.S., 1987. Purification and characterisation of acetylcholinesterase isozymes from the latex of *Synadenium grantii* Hook , ‘f’. *Indian J. Biochem. Biophys.* 24 (4), 209–217.

- Heddle, J.A., 1973. A rapid in vivo test for chromosomal damage. *Mutat. Res.*, 18 (2), 187–190.
- Jäger, A.K., Hutchings, A., van Staden, J., 1996. Screening of Zulu medicinal plants for prostaglandin-synthesis inhibitors. *J. Ethnopharmacol.* 52 (2), 95–100.
- Jassbi, A.R., 2006. Chemistry and biological activity of secondary metabolites in *Euphorbia* from Iran. *Phytochemistry*, 67 (18), 1977–1984.
- Kang, Y.H., Lee, K-A., Ryu, C.J., Lee, H.G., Lim, J.S., Park, S.N., Paik, S.G., Yoon, D.Y., 2006. Mitomycin C induces apoptosis via Fas/FasL dependent pathway and suppression of IL-18 in cervical carcinoma cells. *Cancer Lett.* 237 (1), 33–44.
- Kinghorn, A.D., 1980. Major skin-irritant principle from *Synadenium grantii*. *J. Pharm. Sci.* 69 (12), 1446–1447.
- Kraut, A., Drnovsek-Olup, B., 1996. Instillation of mitomycin C after recurrent pterygium surgery. *Eur. J. Ophthalmol.* 6 (3), 264–267.
- Marques, R.C.P., Medeiros, S.R.B., Dias, C.S., Barbosa-Filho, J.M., Agnez-Lima, L.F., 2003. Evaluation of the mutagenic potential of yangambin and the hydroalcoholic extract of *Ocotea duckei* by Ames test. *Mutat. Res.* 536 (1-2), 117–120.
- Mendonça, R.J., 2004. Caracterização biológica de uma fração angiogênica do latex natural da seringueira *Hevea brasiliensis*. Master's dissertation. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- Menonn, M., Vithayathil, P.J., Raju, S.M., Ramadoss, C.S., 2002. Isolation and characterization of proteolytic enzymes from the latex of *Synadenium grantii* Hook, 'f'. [Plant Sci.](#) 163 (1), 131–139.

- Mrué, F., 1997. Substituição do esôfago cervical por prótese bio sintética de látex: estudo experimental em cães. Master's dissertation. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- Nogueira, I.A.L., Leão, A.B.B., Vieira, M.S., Benfica, P.L., Cunha, L.C., Valadares, M.C., 2008. Antitumoral and antiangiogenic activity of *Synadenium umbellatum* Pax. J. Ethnopharmacol. 120 (3), 474–478.
- Oliveira, R.B., Cunha, L.C., Valadares, M.C., Peres Filho, M.J., Araújo, D.M., Paula, J.R., Bastos, M.A., 2005. Toxicidade aguda de látex e extrato etanólico de folhas de *Synadenium umbellatum* em camundongos. Rev. Eletr. Farm. 2 (2), 143–145.
- Ortêncio, W.B., 1997. Medicina popular do Centro-Oeste. 2nd ed. Thesaurus, Brasília, DF.
- Premaratna, A., Shadaksharaswamy, M., Nanjappa, S., 1981. Isolation, purification & properties of a lectin from the latex of *Synadenium grantii* Hook f. Indian J. Biochem. Biophys. 18 (1), 32–35.
- Rajesh, R., Nataraju, A., Gowda, C.D.R., Frey, B.M., Frey, F.J., Vishwanath, B.S., 2006. Purification and characterization of a 34-kDa, heat stable glycoprotein from *Synadenium grantii* latex: action on human fibrinogen and fibrin clot. Biochimie, 88 (10), 1313–1322.
- Reis, P.R.M., Andrade, L.S., Silva, C.B., Araújo, L.M.M., Pereira, M.S., Mrué, F., Chen-Chen, L., in press. Angiogenic activity of *Synadenium umbellatum* Pax. Braz. J. Biol. 70.
- Ribeiro, L.R., Salvatori, D.M.F., 2003. Dietary components may prevent mutation-related diseases in humans. Mutat. Res. 544 (2-3), 195–201.

- Sartorelli, L., Mantovani, G., Ciman, M., 1989. Carnitine and deoxycarnitine concentration in rat tissues and urine after their administration. *Biochim. Biophys. Acta* 1006 (1), 15–18.
- Silva, I., Franco, S.L., Molinari, S.L., Conegero, C.I., Miranda Neto, M.H., Cardoso, M.L.C., Sant'ana, D.M.G., Iwanko, N.S., 1995. Noções sobre o organismo humano e utilizações de plantas medicinais. 3rd ed. Assoeste Editora Educativa, Cascavel.
- Uzabakiliho, B., Largeau, C., Casadevall, E., 1987. Latex constituents of *Euphorbia candelabrum*, *E. grantii*, *E. tirucalli* and *Synadenium grantii*. *Phytochemistry* 26 (11), 3041–3045.
- Valadares, M.C., Castro, N.C., Cunha, L.C., 2007. *Synadenium umbellatum*: citotoxicidade e danos ao DNA de células da medula óssea de camundongos. *Rev. Bras. Ciênc. Farm.* 43 (4), 631–638.
- Verschaeve, L., Kestens, V., Taylor, J.L.S., Elgorashi, E.E., Maes, A., Van Puyvelde, L., De Kimpe, N., Van Staden, J., 2004. Investigation of the antimutagenic effects of selected South African medicinal plant extracts. *Toxicol. in Vitro* 18 (1), 29–35.
- Vilar, J.B., Ferreira, F.L., Ferri, P.H., Guillo, L.A., Chen-Chen, L., 2008. Assessment of the mutagenic, antimutagenic and cytotoxic activities of ethanolic extract of araticum (*Annona crassiflora* Mart. 1841) by micronucleus test in mice. *Braz. J. Biol.* 68 (1), 141–147.
- Zeiger, E., 2003. Illusions of safety: antimutagens can be mutagens, and anticarcinogens can be carcinogens. *Mutat. Res.* 543 (3), 191–194.

Table 1

Frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) and polychromatic/ normochromatic erythrocytes ratio (PCE/NCE) observed in mice bone marrow treated with different concentrations of *Synadenium umbellatum* latex (SuL) and/or mitomycin C (MMC) and their respective controls.

Treatment (mg/kg)	No. of animals	MNPCE				PCE/NCE
		Individual data ^a	No.	%	Mean $\pm$ SD ^a	
Distilled water	5	2-3-3-2-1	11	0.22	2.2 ^c $\pm$ 0.83	0.97 ^c
MMC (4 mg/kg)	5	18-13-14-15-18	78	1.56	15.6 ^b $\pm$ 2.30	0.35 ^b
SuL (mg/kg)						
10	5	3-2-4-2-2	13	0.26	2.6 ^c $\pm$ 0.89	0.89 ^c
30	5	7-6-5-9-7	34	0.68	6.8 ^{b,c} $\pm$ 1.48	0.69 ^{b,c}
50	5	11-8-10-10-9	48	0.96	9.6 ^{b,c} $\pm$ 1.14	0.54 ^{b,c}
100	5	15-11-10-12-16	64	1.28	12.8 ^b $\pm$ 2.58	0.36 ^b
SuL + MMC						
10 + 4	5	6-4-5-4-3	22	0.44	4.4 ^{b,c} $\pm$ 1.14	0.73 ^{b,c}
30 + 4	5	12-7-9-9-12	49	0.98	9.8 ^{b,c} $\pm$ 2.16	0.41 ^b
50 + 4	5	16-13-11-13-10	63	1.26	12.6 ^b $\pm$ 2.30	0.36 ^b
100 + 4	5	20-19-13-17-18	87	1.74	17.4 ^b $\pm$ 2.70	0.32 ^b

^a Per 1000 polychromatic erythrocytes per mouse.

^b Statistically different from the negative control (distilled water) ($P < 0.05$).

^c Statistically different from the positive control (MMC). ($P < 0.05$).

Capítulo 2

2º Manuscrito

Aceito para publicação no Brazilian Journal of Biology em 05/01/09, com data prevista para publicação em fevereiro de 2010, volume 70.

Angiogenic activity of *Synadenium umbellatum* Pax latex

Paulo Roberto de Melo-Reis^a, Laryssa Silva-de-Andrade^c, Cláudio Braz-da-Silva^a, Luiz Murilo Martins-de-Araújo^a, Manoel Santos-Pereira^a, Fátima Mrue^b, Lee Chen-Chen^{c*}

^a*Departamento de Biomedicina, Laboratório de Estudos Experimentais e Biotecnológicos (LEB) – Universidade Católica de Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil.*

^b*Departamento de Medicina, Universidade Católica de Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil*

^c*Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás. Campus-II Goiânia, Goiás, Brazil.*

Nº. Figures: 4

Palavras-chaves: Angiogênese, látex, membrana corio-alantóide de galinha, *Synadenium umbellatum*

Keywords: Angiogenesis, latex, chick chorioallantoic membrane, *Synadenium umbellatum*

Título abreviado: Angiogenic activity of *S. umbellatum* latex

Address to correspondence:

*Profa. Dra. Lee Chen Chen

Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade

Federal de Goiás, Post Box No. 131, Campus-II 74001-970, Goiânia – GO, Brazil

Tel.: + 55-62-3521-1483; fax: + 55-62-3521-1190

E-mail: *chenleego@yahoo.com.br*

Abstract

Synadenium umbellatum Pax, popularly known as “cola-nota”, is a medicinal plant that grows in tropical regions. Latex of this plant is used to treat various diseases such as diabetes mellitus, Hansen’s disease, tripanosomiasis, leukemia and several malignant tumors. In the present study, the angiogenic activity of *S. umbellatum* latex was evaluated using the chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay. Results showed significant increase of the vascular net ($p < 0.05$) compared to the negative control (H_2O). The histological analysis was in accordance with the results obtained. In conclusion, our data indicate that *S. umbellatum* latex, under the conditions of this research, presented angiogenic effect.

Resumo

Atividade angiogênica do látex de *Synadenium umbellatum* Pax.

Synadenium umbellatum Pax, popularmente conhecida como “cola-nota”, é uma planta medicinal que cresce em regiões tropicais. O látex desta planta tem sido utilizado no tratamento de várias doenças, como diabetes mellitus, hanseníase, tripanossomíases, leucemia e vários tumores malignos. No presente estudo, a atividade angiogênica do látex de *S. umbellatum* foi avaliada pelo ensaio da membrana corio-alantóide (CAM) de ovo embrionado de galinha. Os resultados mostraram aumento significativo da rede vascular ($p < 0.05$) em relação ao controle negativo (H_2O). A análise histológica está em concordância com os resultados obtidos. Em conclusão, os dados indicaram que, nas condições experimentais deste estudo, o látex de *S. umbellatum* exibiu efeito angiogênico.

1. Introduction

Angiogenesis, the formation of new blood vessels from a preexisting vasculature, is a process involving the proliferation and migration of endothelial cells (ECs) and occurs during normal wound healing. Angiogenesis involves a series of coordinated events: proliferation of ECs, migration to distal sites, cell realignment, vessel formation, and production of a new basement membrane (Folkman, 2003). Revascularization may be beneficial in the recovery from injuries such as ischaemic stroke (Krupinski et al, 2003, Slevin et al., 2005), but might be detrimental in promoting tumor growth and metastasis, diabetic retinopathy, and atherosclerosis (Slevin et al., 2006).

Plants have been used as medicine for thousands of years (Samuelson, 2004) and tropical rain forests represent a vast reservoir of potential drug species. The potential for finding more compounds is enormous since currently only about 1% of tropical species have been thoroughly investigated for their pharmaceutical potential (Gurib-Fakim, 2006). Various species of plants have shown angiogenic actions. The extracts of *Ginkgo biloba*, *Aloe vera*, *Angelica sinensis*, *Dalbergia odorifera*, *Epimedium sagittatum*, *Patrinia villosa* and *Trichosanthes kirilowii* enhanced angiogenesis *in vivo* (Juarez et al., 2000; Choi et al., 2002; Wang et al., 2004).

Synadenium umbellatum Pax (Euphorbiaceae), popularly known as “cola-nota”, “avelós”, “milagrosa”, “cancerola”, is a medicinal plant that grows in tropical regions, both in America and Africa. The latex of this plant is used against various diseases such as diabetes mellitus, Hansen’s disease, tripanosomiasis, leukemia, and several malignant tumors (Ortêncio, 1997). The mutagenic, cytotoxic, antitumoral and antiangiogenic action of the leaves of this plant have been already identified (Valadares et al., 2007; Nogueira et al., 2008). In folk medicine, the latex of plants

belonging to the genus *Synadenium* has been considered caustic and toxic. Studies carried out with *Synadenium grantii* Hook showed the presence of toxic substances and proteolytic enzymes in its latex (Govindappa *et al.*, 1987, Jäger *et al.*, 1996; Menonn *et al.*, 2002). Also, other species of this genus, demonstrated anti-inflammatory activity (Jäger *et al.*, 1996).

In the present study, we aimed at evaluating the angiogenic activity of *S. umbellatum* latex using the chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay.

2. Materials and Methods

2.1. Synadenium umbellatum latex

S. umbellatum latex was collected in Goiânia, in the state of Goiás, Brazil, in November 2007. A voucher specimen was deposited at the Herbarium of the Federal University of Goiás under the number 40.006/UFG. The sap was extracted through incisions in the trunk, at the height of 100 cm (3.28 feet) in relation to the soil. The secretory cells drained and 1.0 mL of this latex was collected directly in a sterile plastic syringe immediately transferred to a container of sterile glass container with 9 mL of sterile distilled water. This material was stocked at 4° C for a maximum period of 30 days (Mendonça, 2004, Mrué, 1997).

The density of the pure latex was 1g/mL. Later, it was diluted with distilled water to obtain the concentrations of 10 and 20 mg/mL

2.2. Fertilized chicken eggs

We obtained 100 fertile chicken eggs (*Galilus domesticus*) lineage Rhoss from Zootechnics Department of the Catholic University of Goiás, Brazil, to be used in this experiment.

2.3. Drugs and reagents

We used the following drugs and reagents in this study: sterile H₂O (Halex Istar Indústria Farmacêutica Ltda), 4mg/mL dexamethasone solution (C₂₂H₂₉FO₅) (Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A –lot nº 2668), latex biomembrane (Biocure) (Pele Nova Biotecnologia lot nº 04080100), Leishman dye (Doles Reagentes), formaldehyde 37% (Rioquímica Ltda, lot nº 0402296), and paraffin (Petrobras).

2.4. Experimental design

We incubated five groups of 20 fertilized chicken eggs at 37° C in a humidified atmosphere (60-70% relative humidity). On day 5 of incubation a circular window was opened in the large end of the eggshell, the membrane was removed, and the eggs were returned to the incubator. Filter paper disks were soaked up with 3 µL of an aqueous solution of *S. umbellatum* latex at 10mg/mL (30 µg) and 20 mg/mL (60 µg) of *S. umbellatum* and were placed on top of growing CAM at day 13 of incubation under sterile conditions. Positive (Biocure), negative (3 µL water) and inhibitor (12 µg dexametasone) controls were included.

The angiogenic response was evaluated 72 hours after the treatments. CAMs were fixed in formaldehyde solution (3.7%) for 5 min, cut with curves blunt scissors and maintained in Petri dishes in the presence of formaldehyde solution.

2.5. Obtaining images and automated measure of the angiogenesis

Through a digital camera (Sony Cyber-shot 6.0 mega pixels) CAM pictures were taken on a white background, at 640 X 480 pixels and 24-bit RGB. Analysis and quantification of the neoformed vascular net were made through the captured images. The percentage area of each assay was determined using the programs *Gimp for Windows (version 2.0.5)* and *Image J (version 1.28)*. The images were prepared so that the saturation, light and contrast allowed a better resolution of the blood vessels which were quantified in corresponding pixels. The amount of selected pixels is proportional to the level of vascularization of the captured image field (Doukas, 2006a, 2006b; Blat *et al.*, 2004; Mendonça, 2004; Mansur *et al.*, 2006).

2.6. Histological analysis

CAM of the fertilized chicken eggs with vascular neo-formed network was fixed in 10% formaldehyde solution and embedded in paraffin. After that sections were cut from each block, stained with hematoxylin-eosin (HE) and examined in a light microscopy. CAM pictures were obtained using a JVC TK1270 camera coupled to a microscope and the images were captured by plate Pinnacle Studio AV/DV Deluxe.

2.7. Statistical analysis

In order to analyze the angiogenic activity of *S. umbellatum* latex, the percentage areas of CAM obtained in the treated and control groups were compared by Kruskal-Wallis one way analysis of variance on ranks followed by multiple comparison procedure (Dunn's method). P values less than 0.05 ($p < 0.05$) were considered as indicative of significance.

3. Results

The results obtained from the neoformed vascular net were analyzed using two different processes. In the first one, the percentage of vascular net area for *S. umbellatum* latex and the different controls was calculated and the images of vascular net were shown. In the second, histological analysis of the neoformed vascular net were carried out.

Table 1 presents the results of vascularization percentage in CAM after treatment using two different concentration of *S. umbellatum* latex and the controls.

In the treatments using *S. umbellatum* latex at the concentrations of 10 mg/mL and 20 mg/mL of latex of *S. umbellatum*, the vascularization percentage means were 49.1 and 52.9 respectively, while the negative control (water) was 32.6. The two concentrations of latex exhibited a significant increase of vascular net percentage compared both to the negative control ($P < 0.05$) and the inhibitor ($P < 0.05$). We did not observe a significant difference among the two doses of latex and the positive control ($P > 0.05$). The inhibitor (dexamethasone) showed a considerable reduction

compared to the negative control (H₂O), although we did not find a significant difference between these controls using the Kruskal Wallis test ($p>0.05$).

The images of the vascular net of the group treated with the latex (10 mg/mL) and the different control groups of controls are shown in Figure 2. In this figure, it is possible to observe a clear difference in formation of vascular net among the group treated with latex and the different controls groups. A larger vascularization was observed in the positive control group as well as in the group treated with *S. umbellatum* latex. The vascularization was smaller in the negative control and inhibitor groups. The pure latex was also tested, but it destroyed CAM completely and killed the chick embryo.

Figure 3 shows the images of histological analysis, exhibiting the formation of the vascular networks in the different controls and in the group treated with 10 mg/mL of *S. umbellatum* latex.

The Figure 4 presents a detail of Figure 3H, showing the formation of the blood vessels and inflammatory elements caused by the treatment using *S.umbellatum* latex.

4. Discussion

For centuries, plants have been widely used as food and for medicinal purposes in different cultures. In the last few years, the interest in plant medicines has increased worldwide.

Because of the immense flora existing all over the world along with cultural aspects, the use of plants in the form of crude extracts, infusions, or plasters has

been revived as a usual practice to treat common diseases (Marques and Farah, 2009).

Nogueira *et al.* (2008) have already investigated the pharmacological actions of the ethanolic crude extract of aerial parts of *S. umbellatum* and confirmed the antitumoral and antiangiogenic effects of this plant. Also the latex of plants belonging to the genus *Synadenium* is a common source of folk medicine, mainly to treat cancer (Ortêncio, 1997) and some of its biological activities have been identified (Afonso-Cardoso *et al.*, 2007; Rogério *et al.*, 2007; Premaratna *et al.*, 1984). Thus, we aimed at evaluating the angiogenic activity of the *S. umbellatum* latex on chick embryo.

The CAM assay has been widely used as an *in vivo* model to study the angiogenic activity of various agents, e.g. growth factors, cytokines, hormones, drugs, tissue extracts and implanted tissue grafts (Zwadlo-Klarwasser *et al.*, 2001). Toxicity of drugs on chick embryos can be evaluated by embryo death or adverse effects on CAM, including inflammation and neovascularization (Vargas *et al.*, 2007).

The results obtained in this study demonstrated that the treatments using 10 and 20 mg/mL *S. umbellatum* latex showed a significant increase of percentage area of vascular net in fertilized chicken eggs compared to the negative and inhibitor control groups ($p < 0.05$). However, there was not a significant increase in latex induction of neoformed vascular net when compared to the positive control ($p > 0.05$). The angiogenic activity was measured by counting the number of blood vessels in a given area (Staton *et al.*, 2004). There was a significantly increase of vascularization in the positive control and in the group treated with *S. umbellatum* latex compared to the negative and inhibitor controls ($P < 0.05$) (Figure 2).

The different formations of vascular net evaluated by histological analysis in the different controls and in group treated with the latex of the plant (Figure 3) are in accordance with the digital images presented. We can observe an evident inhibition of blood vessels by dexamethasone (inhibitor control) since these areas showed poor vascularization (Figures 3A and 3B). We also observed poor blood vascular structures in the negative control (Figures 3E and 3F). The positive control (Figures 3C and 3D) and the treatments using *S. umbellatum* latex (Figures 3G and 3H) presented a relevant increase in vascular net as well as infiltrated inflammatory cells (Figure 4 – detail of Figure 3H).

All the results herein obtained using CAM assays in vascular net (percentage of vascularization, digital images, and histological analysis) allow to infer that *S. umbellatum* latex stimulated the growth of new vessels in CAM.

We observed in our experiment that even a small quantity of the pure latex killed the chick embryo (results not shown here) proving it is very toxic. Vargas *et al.* (2007) showed that toxic substances can induce inflammatory response. As *S. umbellatum* latex is toxic, it probably stimulated inflammatory responses which permitted the migration of neutrophils and macrophages cells shown in Figure 4.

It has already been pointed out in the literature that the inflammatory cells are important to activate factors such as cytokines, interleukins (IL-1, IL-2 and IL-8), vascular endothelial growth factor (VEGF), and platelet activating factor. These are endothelial cell-specific growth factors and have an important role in the initiation and amplification of inflammatory response (Zijlstra *et al.*, 2006), and consequently in activating angiogenic factors (Donà *et al.* 2003; May *et al.*, 2008), since all of them induce the growth of the pre-existing vessels and neoformation of others in CAM.

5. Conclusion

In the present research, the angiogenic activity of *S. umbellatum* latex was evaluated using the CAM assay and the results showed that it presents angiogenic activity.

6. Acknowledgements

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG).

7. References

- AFONSO-CARDOSO, SR., RODRIGUES, FH., GOMES, MA., SILVA, AG., ROCHA, A., GUIMARÃES, AH., CANDELORO, I., FAVORETO, S JR., FERREIRA, MS. and DE SOUZA, MA., 2007. Protective effect of lectin from *Synadenium carinatum* on *Leishmania amazonensis* infection in BALB/c mice. *Korean J. Parasitol.*, vol. 45, no. 4, p. 255-266.
- CHOI, S., KIM, KW., CHOI, JS., HAN, ST., PARK, YI., LEE, SK., KIM, JS. and CHUNG, MH., 2002. Angiogenic activity of beta-sitosterol in the ischaemia/reperfusion-damaged brain of Mongolian gerbil. *Planta Med.*, vol. 68, no. 4, p. 330–335.
- DONÀ, M., DELL'AICA, I., CALABRESE, F., BENELLI, R., MORINI, M., ALBINI, A. and GARBISA, S., 2003. Neutrophil Restraint by Green Tea: Inhibition of Inflammation, Associated Angiogenesis, and Pulmonary Fibrosis. *J. Immunol.*, vol. 170, no. 8, p. 4335 - 4341.

- FOLKMAN, J., 2003. Fundamental concepts of the angiogenic process. *Curr. Mol. Med.*, vol. 3, no. 7, p. 643–651.
- GOVINDAPPA, T., GOVARDHAN, L., JYOTHY, PS. and VEERABHADRAPPA, PS., 1987. Purification and characterisation of acetylcholinesterase isozymes from the latex of *Synadenium grantii* Hook, 'f. *Indian J. Biochem. Biophys.*, vol. 24, no. 4, p. 209-217.
- GURIB-FAKIM, A., 2006. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol. Aspects Med.*, vol. 27, no. 1, p. 1-93.
- JÄGER, AK., HUTCHINGS, A. and VAN STADEN, J., 1996. Screening of Zulu medicinal plants for prostaglandin-synthesis inhibitors *J. Ethnopharmacol.*, vol. 52, no. 2, p. 95-100.
- JUAREZ, CP., MUIÑO, JC., GUGLIELMONE, H., SAMBUELLI, R., ECHENIQUE, JR., HERNÁNDEZ, M. and LUNA, JD., 2000 Experimental retinopathy of prematurity: angiostatic inhibition by nimodipine, ginkgobiloba, and dipyridamole, and response to different growth factors. *Eur. J. Ophthalmol.*, vol. 10, no. 1, p. 51–59.
- KRUPINSKI, J., STROEMER, P., SLEVIN, M., MARTI, E., KUMAR, P. and RUBIO, F., 2003. Three-dimensional structure and survival of newly formed blood vessels after focal cerebral ischemia. *Neuroreport*, vol. 14, no. 8, p. 1171–1176.
- MARQUES, V. and FARAH, A., 2009. Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. *Food Chem.*, 113, no. 4, 1370-1376.
- MAY, AE., SEIZER, P. and GAWAZ, M., 2008. Platelets: Inflammatory Firebugs of vascular walls. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 28, no. 3, p. 5-10.
- MENDONÇA, RJ., 2004. *Caracterização biológica de uma fração angiogênica do látex natural da seringueira – Hevea brasiliensis*. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

MENONN, M., VITHAYATHIL, P.J., RAJU, SM. and RAMADOSS, CS., 2002.

Isolation and characterization of proteolytic enzymes from the latex of *Synadenium grantii* Hook, 'f . *Plant Sci.*, vol. 163, no. 1, p. 131-139.

MRUÉ, F., 1997. Substituição do Esôfago Cervical por Prótese Biossintética de Látex - Estudo Experimental em Cães. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

NOGUEIRA, IAL., LEÃO, ABB., VIEIRA, MS., BENFICA, PL., CUNHA, LC. and VALADARES, MC., 2008. Antitumoral and antiangiogenic activity of *Synadenium umbellatum* Pax. *J. Ethnopharmacol.*, vol. 120, no. 3, p. 474-478.

ORTÊNCIO, WB., 1997. *Medicina popular do Centro-Oeste*. 2th ed., p.59. Thesaurus, Brasília, 322p.

PREMARATNA, A., SHDAKSHARASWAMY, M. and NANJAPPA, S., 1984. Some biological properties of *Synadenium grantii* lectin. *Indian J. Pathol. Microbiol.*, vol. 27, no.2, p. 91-97.

ROGERIO, AP., CARDOSO, CR., FONTANARI, C., SOUZA, MA., AFONSO-CARDOSO, SR., SILVA, EV., KOYAMA, NS., BASEI, FL., SOARES, EG., CALIXTO, JB., STOWELL, SR., DIAS-BARUFFI, M. and FACCIOLI, LH., 2007. Anti-asthmatic potential of a D-galactose-binding lectin from *Synadenium carinatum* latex. *Glycobiology*, vol. 17, n. 8, p. 795-804.

SAMUELSSON, G., 2004. *Drugs of Natural Origin: a Textbook of Pharmacognosy*. 5th ed. Swedish Pharmaceutical Press, Stockholm.

SLEVIN, M., KRUPINSKI, J., KUMAR, P., GAFFNEY, J. and KUMAR, S., 2005. Gene activation and protein expression following ischaemic stroke: strategies towards neuroprotection. *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 9, no. 1, p.85– 102

SLEVIN, M., KUMAR, P., GAFFNEY, J., KUMAR, S. and KRUPINSKI, J., 2006. Can angiogenesis be exploited to improve stroke outcome? Mechanisms and therapeutic potential. *Clin. Sci. (Lond.)*, vol. 111, no. 3, p. 171–183

STATON, CA., STRIBBLING, SM., TAZZYMAN, S., HUGHES, R., BROWN, NJ. and LEWIS, CE., 2004. Current methods for assaying angiogenesis in vitro and in vivo. *Int. J. Exp. Path.*, vol. 85, no. 5, p. 233-248.

VALADARES, MC., CASTRO, NC. DE, CUNHA, LC. DA, 2007. *Synadenium umbellatum*: citotoxicidade e danos ao DNA de células da medula óssea de camundongos. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, vol. 43, no. 4, p. 631-638.

VARGAS, A., ZEISSER-LABOUÈBE, M., LANGE, N., GURNY, R. and DELIE, F., 2007. The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the *in vivo* evaluation of drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 59, no. 11, p. 1162-1176.

WANG, S., ZHENG, Z., WENG, Y., YU, Y., ZHANG, D., FAN, W., DAI, R. and HU, Z., 2004. Angiogenesis and anti-angiogenesis activity of Chinese medicinal herbal extracts. *Life Sci.*, vol. 74, no. 20, p. 2467–2478.

ZIJLSTRA, A., SEANDEL, M., KUPRIYANOVA, TA., PARTRIDGE, JJ., MADSEN, MA., HAHN-DANTONA, EA., QUIGLEY, JP and DERYUGINA, EI., 2006. Proangiogenic role of neutrophil-like inflammatory heterophils during neovascularization induced by growth factors and human tumor cells. *Blood*, vol. 107, no. 1, p. 317-327.

ZWADLO-KLARWASSER, G., GÖRLITZ, K., HAFEMANN, B., KLEE, D. and KLOSTERHALFEN, B., 2001. The chorioallantoic membrane of the chick embryo as a simple model for the study of angiogenic and inflammatory response to biomaterials. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 12, no. 3, p. 195-199.

Table1. Vascularization percentage obtained with treatment of *S. umbellatum* latex and different controls.

<i>S. umbellatum</i> latex	Vascularization percentage	Mean $\pm$ SD
10 mg/mL (3 μ L)	47.2, 52.9, 46.5, 62.4, 54.4, 52.5, 51.6, 57.8, 56.3, 43.5, 58.6, 48.6, 50.2, 47.2, 58.4, 46.2, 55.7, 51.9, 49.1, 42.4	49.1 $\pm$ 5.58#
20 mg/mL (3 μ L)	60.5, 57.1, 48.9, 50.7, 55.6, 54.8, 47.9, 52.4, 58.3, 60.1, 46.5, 56.4, 49.3, 54.7, 55.2, 51.6, 46.3, 50.7, 52.1, 48.3	52.9 $\pm$ 4.35#
H ₂ O (3 μ L) (negative control)	36.3, 32.5, 38.5, 33.6, 29.1, 37.2, 28.7, 35.6, 33.2, 30.1, 28.5, 27.9, 32.1, 35.5, 30.2, 33.7, 32.8, 28.2, 33.7, 34.6	32.6 $\pm$ 3.19*
Dexamethasone (12 μ g) (inhibitor)	9.6, 14.7, 14.3, 15.6, 12.4, 11.9, 10.8, 9.5, 9.1, 12.9, 13.5, 12.1, 11.3, 9.8, 10.3, 9.3, 14.1, 12.5, 10.2, 11.5	11.8 $\pm$ 1.96*
Biocure (positive control)	55.8, 52.3, 58.6, 53.8, 57.4, 50.9, 58.7, 59.2, 54.3, 53.2, 57.1, 54.6, 58.9, 51.5, 57.6, 56.3, 54.9, 52.6, 55.5, 60.3	55.7 $\pm$ 2.77#

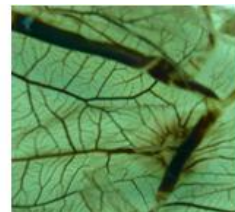
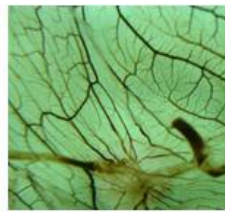
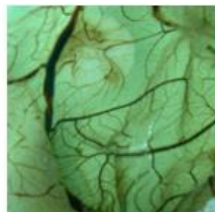
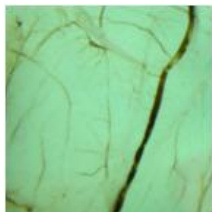
Same symbols (p > 0.05) Different symbols (p < 0.05)

All the results were compared to controls groups by Kruskal-Wallis one way ANOVA on ranks and followed by multiple comparison procedure.

P values less than 0.05 (p<0.05) were considered as indicative of significance.



Figure 1 - Chorioallantoic membrane from a fertilized chicken egg presenting vascular net at 12 days of incubation.



Inhibitor control

Negative control

S. umbellatum latex

Positive control

Figure 2 – Formation of the vascular network in different controls and in the treatment using *S. Umbellatum* latex.

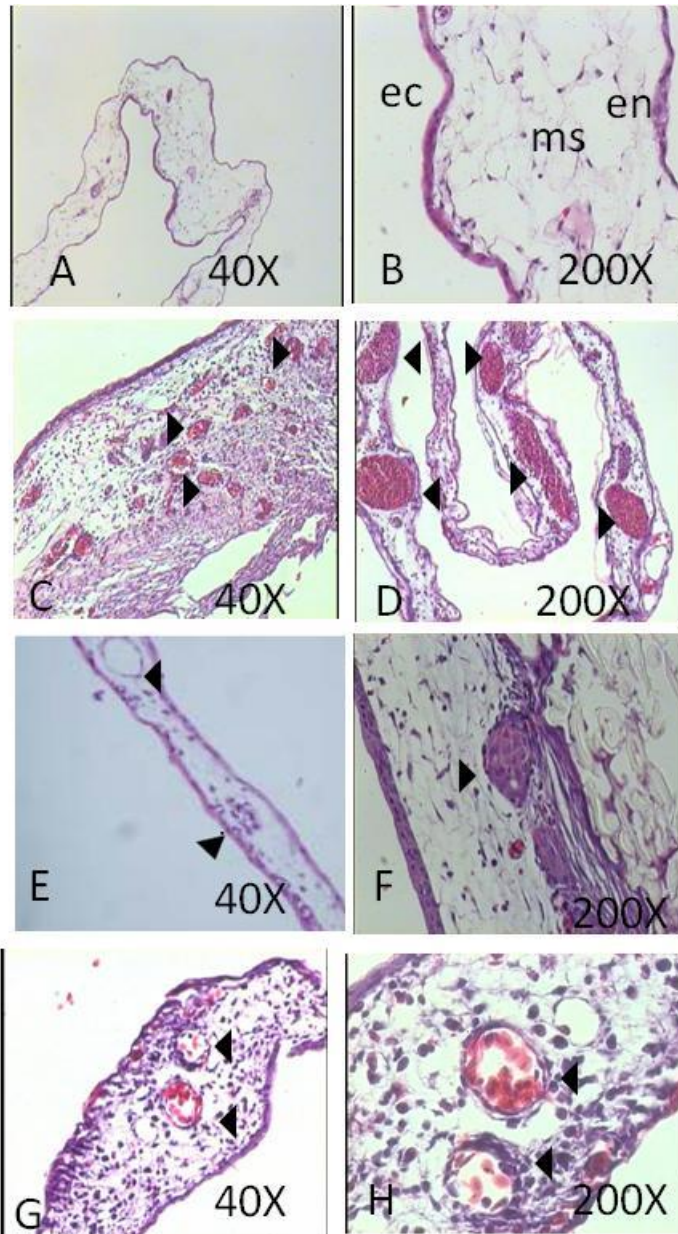


Figure 3 - Paraffin sections stained with hematoxylin-eosin. Control inhibitor (dexamethasone) shows a few conjunctive tissue cells and also few blood vessels (A and B). Positive control (*Hevea brasiliensis* latex biomembrane) shows some newly formed blood vessels and inflammatory elements (C and D) and, in detail, well formed blood vessels and many nuclear erythrocytes (D). For the negative control (distilled water), the arrows show few blood vessels structures (E and F). Treatment using *S. umbellatum* latex shows well organized vessels, replete of nuclear erythrocytes and inflammatory elements (G and H):
ec = ectoderm ms = mesoderm en = endoderm.

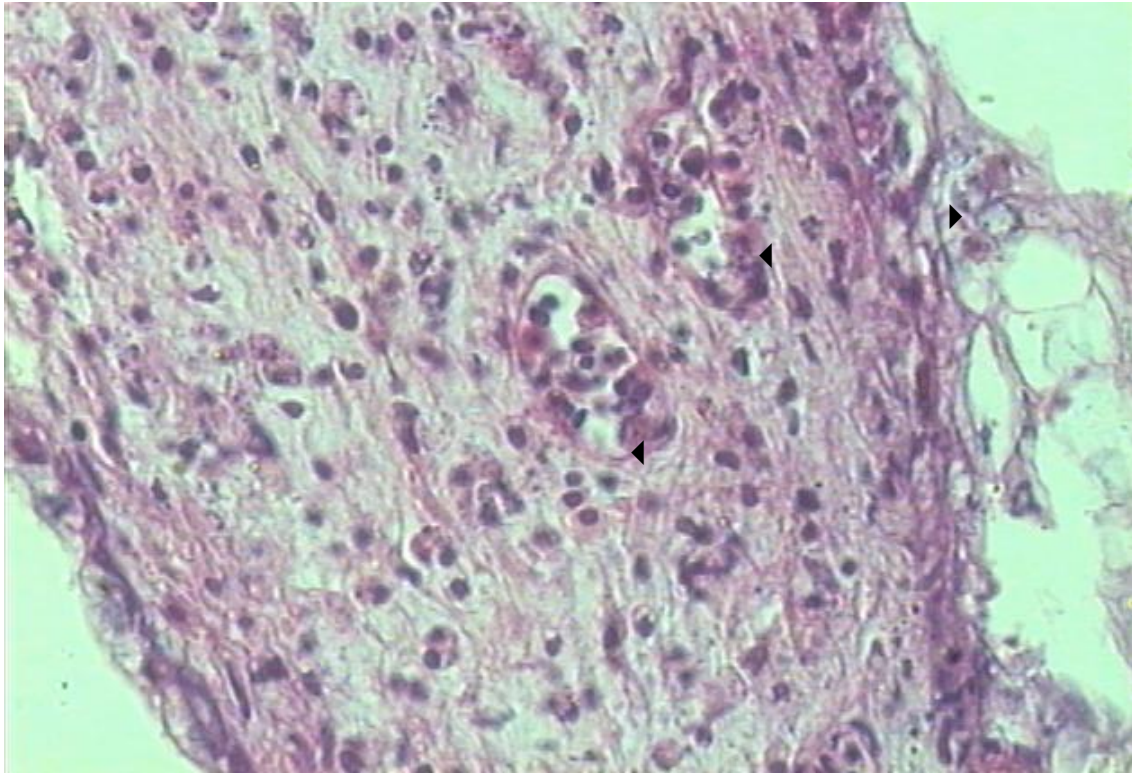


Figure 4 – Treatment using *S.umbellatum* latex (Detail of fig. 3H)

Note the presence of fibroconjunctive tissues, blood vessels well formed, nuclear erythrocytes within the lumen of new vasculature and inflammatory elements.

Capítulo 3

3º – Manuscrito

Wound healing activity of *Synadenium umbellatum* latex in rats

Paulo Roberto de Melo-Reis, Laryssa Silva-de-Andrade-Bezerra, Cláudio Braz-da-Silva, Fátima Mrue, Martha Araújo-Alencar-Brandão-do-Vale, Lee Chen-Chen*

Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás. Campus-II Goiânia, Goiás, Brazil

Nº. Figures: 1

Título abreviado: Wound healing activity of S. umbellatum latex in rats

Address to correspondence:

*Profa. Dra Lee Chen Chen

Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Post Box No. 131, Campus-II 74001-970, Goiânia – GO, Brazil

Tel.: + 55-62-3521-1483; fax: + 55-62-3521-1190

Abstract

Synadenium umbellatum Pax, popularly known as “cola-nota”, is a medicinal plant that grows in tropical regions. Latex of this plant is used to treat various diseases such as diabetes mellitus, leukemia, several malignant tumors and wound-healing. To evaluate the wound healing activity of the latex plant, rectangular excision wound model was employed on rats. Wistar rats were daily treated with 5 mL of latex solution (10 mg/mL) topically. The percentage wound closure was measured. Topical application of *S. umbellatum* latex in excision wound model increased significantly the percentage of wound contraction when compared to negative control ($p < 0.05$). In conclusion, the *S. umbellatum* latex accelerated wound healing in rats under the experimental conditions of this work.

Keywords: *S. umbellatum* latex, wound healing, rats.

Resumo

Atividade cicatrizante do látex de *Synadenium umbellatum* em ratos

Synadenium umbellatum Pax, popularmente conhecido como “cola-nota”, é uma planta medicinal que cresce em regiões tropicais. O látex desta planta tem sido utilizado no tratamento de várias doenças, como diabetes mellitus, hanseníase, tripanossomíases, leucemia e vários tumores malignos. Para avaliar a atividade cicatrizante do látex da planta, o modelo de excisão foi utilizado em ratos. Ratos Wistar foram tratados diariamente com 5 mL de solução de látex (10 mg/mL) topicamente. O percentual de fechamento de ferida foi

mensurado. A aplicação tópica do látex de *S. umbellatum* na ferida aumentou significativamente o percentual de fechamento em relação ao grupo controle negativo ($p < 0,05$). Em conclusão, o látex de *S. umbellatum* acelerou o processo de cicatrização em ratos sob as condições experimentais do presente trabalho.

Palavras-chaves: látex de *S. umbellatum*, cicatrização, ratos.

1. Introduction

Synadenium umbellatum Pax (Euphorbiaceae) (synonyms: *Euphorbia umbellata* and *Synadenium grantii* Hook), commonly known as “cola-nota”, “avelós”, “milagrosa”, and “cancerola”, is a common plant in tropical regions, both in the American and African continents.

Traditionally *S. umbellatum* latex (SuL) is used to treat common diseases such as diabetes mellitus, Hansen’s disease, tripanosomiasis, leukemia, and several malignant tumors (Ortêncio, 1997; Nogueira et al., 2008). The leaves of this plant is reported to possess mutagenic and cytotoxic action (Valadares et al., 2007), toxic effect in mice (Oliveira et al., 2005) and antitumoral and antiangiogenic activity (Nogueira et al., 2008). In folk medicine, the latex of plants belonging to the genus *Synadenium* has been considered caustic and toxic. Several studies have shown the presence of toxic substances and proteolytic enzymes in the latex of this plant species (Govindappa et al., 1987; Jäger et al., 1996; Menonn et al., 2002). Other species of this genus also demonstrated anti-inflammatory activity (Jäger et al., 1996). Recently, using the chick embryo chorioallantoic membrane assay, our research team was able to demonstrate the angiogenic effect of *Synadenium umbellatum* latex (Melo-Reis et al, in press). Angiogenesis, the sprouting of capillaries from preexisting vessels, is the principle process by which organs become vascularized (Folkman & Haudenschild, 1980) and plays an

essential role in wound healing (Bates & Jones, 2003). The present study was carried out to evaluate the action of *S. umbellatum* latex on wound healing activity using *in vivo* excision wound model.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

S. umbellatum latex (SuL) was collected in Goiânia, in the state of Goiás, Brazil, in November 2007. A voucher specimen was deposited at the Herbarium of the Federal University of Goiás under the number 40.006/UFG. The sap was extracted through incisions in the trunk, at the height of 100 cm (3.28 feet) in relation to the soil. The secretory cells drained and 1.0 mL of this latex was collected directly in a sterile plastic syringe immediately transferred to a container of sterile glass container with 9 mL of sterile distilled water. This material was stocked at 4° C for a maximum period of 30 days (Mendonça, 2004, Mrué, 1997).

The density of the pure latex was 1g/mL. Later, it was diluted with distilled water to obtain the concentrations of 10 mg/mL, which was used to perform the present work.

2.2. Animals

The experimental protocol (CEPMHA/HC/UFG no. 037/2008) was approved by the Human and Animal Research Ethics Committee of the Universidade Federal de Goiás. Wistar albino rats of male sex weighting 250 and 350 g were obtained from Biotery of Universidade Católica de Goiás, Brazil. The animals were stabilized for 1 week. They were maintained in standard conditions at room temperature, 55 ± 5% relative humidity and 12 h light dark cycle. They had been given food and water *ad libitum* throughout the course of the study.

2.3. Experimental procedure

The animals were divided into three groups of five animals each (Table 1):

- Group I served as negative control treated with saline solution 0.9%
- Group II served as standard treated with Biomembrane of *Hevea brasiliensis* (Biocure),
- Group III served as test treated with SuL (50 mg/animal/day topically).

This model was used to monitor wound contraction and wound closure time. Each group of animals (five-animals) was anaesthetized by ketamine (87 mg/kg) and xylazin (13 mg/kg). The back hairs of the mice were depilated by shaving. The rectangular wound (3 x 2.5 cm) was created on the dorsal interscapular region of each animal by excising the skin with a pair of sharp scissors and a scalpel. The reference material (Biocure) was changed every three days. The latex and the vehicule (saline solution 0.9%) were administered once a day till the day 21. The progressive changes in wound area were monitored by a camera (Sony Cyber-Shot 6.0 mega pixels) each 7 days. Wound contracting was calculated as percentage of the reduction in wounded area (Van Winkler, 1967; Ramsey et al., 1995).

2.4. Data analysis

In order to analyze the wound healing activity, the percentage of wound contraction area obtained in the treated and controls groups were compared using Kruskal-Wallis one way analysis of variance on ranks and all pairwise were compared by multiple comparison procedures (Tukey Test) and a value of $p < 0.05$ was considered as indicative of significance.

3. Results

In this study, an inquiry on wound healing activity of the *S. umbellatum* latex which has been used in the treatment of wound area was carried out on rats by excision wound model. The measurements of the progress of wound healing induced by the latex, reference drug and negative control are shown in Figure 1.

Our results indicated that the group of animals treated with SuL showed 19.8% of wound contraction area on day seven, that showed no significant difference when compared to negative control (21.9%) and also a reference drug - Biocure (23.6%) ($P > 0.05$).

For the other hand, the SuL demonstrated 79.1% and 97.4% of wound contraction on day fourteen and twenty one respectively . These results were similar to contraction values of the reference drug - Biocure (79.1% and 96.4%) ($p > 0.05$) and these both wound contraction areas (SuL and Biocure) were significantly greater compared to negative control group (70,7 % and 79.7%) ($p < 0.05$) as shown on Table 1.

Thus, the results indicated that topical application of SuL increased the percentage of wound contraction and it almost has completed wound healing area on day twenty one. This fact also may indicate an increase of the velocity of epithelization and collagenization (Deshmukh et al., 2009).

4. Discussion

Wound healing is a process by which damage tissue is restored as closely as possible to its normal state and wound contraction is the process of shrinkage of the area of the wound. It is mainly dependent upon the extent of damage, the general state of health and the ability of the

tissue to repair (Nayak et al., 2007). In our study, the SuL increased the wound contraction when compared to negative control (saline solution) ($P < 0.05$).

Phytochemical studies of members of the family Euphorbiaceae revealed the presence of flavonoids, saponins, diterpenes, and phorbol esters (Bagalkotkar et al., 2006; Jassbi, 2006). The preliminary phytochemical analysis of the *S. umbellatum* latex by various researchers showed the presence of phorbol esters (Kinghorn, 1980), lectins (Premaratna et al., 1981), glycoproteins (Rajesh et al., 2006), diterpene esters (Bagavathi et al., 1988), and triterpenoids (Uzabakiliho et al., 1987). Studies have shown that phytochemical constituents like flavonoids (Tsuchiya et al., 1996) and triterpenoids (Scortichini and Pia, 1991; Asif et al., 2007) are known to promote the wound healing process mainly due to their astringent, antioxidant and anti-microbial properties, which appear to be responsible for wound contraction.

More recently, Rajesh et al. (2006) purified and characterized a heat stable glycoprotein from *S. umbellatum* latex, which has action on human fibrinogen and fibrin clot, which are important steps in the healing process.

However, the exact component of the latex that is responsible for this effect was not known until this moment. Further phytochemical studies are needed to isolate the active compound(s) responsible for this pharmacological activity.

5. Conclusion

The present study demonstrated that *S. umbellatum* latex was capable of promoting wound healing activity in our experimental conditions.

6. Acknowledgements

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) and Fundação de Apoio à Pesquisa da UFG (FUNAPE.)

7. References

- ASIF, A., KAKUB, G., MEHMOOD S., KHUNUM R. and GULFRAZ, M., 2007. Wound healing activity of roots extracts of *Berberis lyceum* royle in rats. *Phytother. Res.*, vol. 21, p. 589-591.
- BAGALKOTKAR, G., SAGINEEDU, SR., SAAD, MS. and STANSLAS, J., 2006. Phytochemicals from *Phyllanthus niruri* Linn. and their pharmacological properties: a review. *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 58, no. 12, p. 1559–1570.
- BAGAVATHI, R., SORG, B. and HECKER, E., 1988. Tiglane-type diterpene esters from *Synadenium grantii*. *Planta Med.*, vol. 54, no. 6, p. 506–510.
- BATES, DO. and JONES, RO., 2003. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *Int. J. Low Extrem Wounds*, vol. 2, no. 2, p. 107-120.
- DESHMUKH, PT., FERNANDES, J., ATUL, A. and TOPPO, E., 2009. Wound healing activity of *Calotropis gigantea* root bark in rats. *J. Ethnopharmacol.*, vol. 125, p. 178-181.
- NAYAK, SB., SANDIFORD, S. and MAXWELL, A., 2007. Evaluation of the wound-healing activity of ethanolic extract extarct of *Morinda citrifolia* L. leaf. *eCAM*, vol. 4, p. 1-6.
- FOLKMAN, J. and HAUDENSCHILD, C., 1980. Angiogenesis in vitro. *Nature*, vol. 288, no. 5791, p. 551-556.
- GOVINDAPPA, T., GOVARDHAN, L., JYOTHY, PS. and VEERABHADRAPPA, PS., 1987. Purification and characterisation of acetylcholinesterase isozymes from the latex of *Synadenium grantii* Hook , ‘f’. *Indian J. Biochem. Biophys.*, vol. 24, no. 4, p. 209–217.

- JÄGER, AK., HUTCHINGS, A. and VAN STADEN, J., 1996. Screening of Zulu medicinal plants for prostaglandin-synthesis inhibitors. *J. Ethnopharmacol.*, vol. 52, no. 2, p. 95–100.
- JASSBI, AR., 2006. Chemistry and biological activity of secondary metabolites in *Euphorbia* from Iran. *Phytochemistry*, vol. 67, no. 18, p. 1977–1984.
- KINGHORN, AD., 1980. Major skin-irritant principle from *Synadenium grantii*. *J. Pharm. Sci.*, vol. 69, no. 12, p. 1446–1447.
- LIJNEN, H.R., 2002. Matrix metalloproteinases and cellular fibrinolytic activity. *Biochemistry*, vol. 67, p. 92–98.
- MELO-REIS, PR., ANDRADE, LS., SILVA, CB., ARAÚJO, LMM., PEREIRA, MS., MRUE, F. and CHEN-CHEN, L., 2010 (in press). Angiogenic activity of *Synadenium umbellatum* Pax. *Braz. J. Biol.*, vol. 70.
- MENDONÇA, RJ., 2004. Caracterização biológica de uma fração angiogênica do latex natural da seringueira *Hevea brasiliensis*. Master's dissertation. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- MENONN, M., VITHAYATHIL, PJ., RAJU, SM. and RAMADOSS, CS., 2002. Isolation and characterization of proteolytic enzymes from the latex of *Synadenium grantii* Hook, 'f'. *Plant Sci.*, vol. 163, no. 1, p. 131–139.
- MRUÉ, F., 1996. Substituição do esôfago cervical por prótese biossintética de látex: estudo experimental em cães. Master's dissertation. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- NOGUEIRA, IAL., LEÃO, ABB., VIEIRA, MS., BENFICA, PL., CUNHA, LC. and VALADARES, MC., 2008. Antitumoral and antiangiogenic activity of *Synadenium umbellatum* Pax. *J. Ethnopharmacol.*, vol. 120, no. 3, p. 474–478.
- OLIVEIRA, RB., CUNHA, LC., VALADARES, MC., PERES FILHO, MJ., ARAÚJO, DM., PAULA, JR. and BASTOS, MA., 2005. Toxicidade aguda de látex e extrato etanólico de

folhas de *Synadenium umbellatum* em camundongos. *Rev. Eletr. Farm.*, vol. 2, no. 2, p. 143–145.

ORTÊNCIO, WB., 1997. Medicina popular do Centro-Oeste. 2nd ed. Thesaurus, Brasília, DF.

PREMARATNA, A., SHADAKSHARASWAMY, M. and NANJAPPA, S., 1981. Isolation, purification & properties of a lectin from the latex of *Synadenium grantii* Hook f. *Indian. J. Biochem. Biophys.*, vol. 18, no. 1, p. 32–35.

RAJESH, R., NATARAJU, A., GOWDA, CDR., FREY, BM., FREY, FJ. and VISHWANATH, BS., 2006. Purification and characterization of a 34-kDa, heat stable glycoprotein from *Synadenium grantii* latex: action on human fibrinogen and fibrin clot. *Biochimie*, vol. 88, no. 10, p. 1313–1322.

REICH, E., RIFKIN, D.B., SHWA, E., 1975. Protease and biological control. *Cold Spring Harbor laboratory*, New York.

SCORTICHINI, M. and PIA, R.M., 1991. Preliminary *in vitro* evaluation of the antimicrobial activity of terpenoids towards *Erwinia amylovora* (Burrill). *J. Appl. Bacteriol.*, vol. 71, p. 109-112.

TSUCHIYA, H., SATO, M., MIYAZAKI, T., FUJIWARA, S., TANIGAKI, S., OHYAMA, M., TNANKA, T. and LINUMA, M., 1996. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Ethnopharmacol.*, vol. 50, p. 27-34.

UZABAKILIHO, B., LARGEAU, C. and CASADEVALL, E., 1987. Latex constituents of *Euphorbia candelabrum*, *E. grantii*, *E. tirucalli* and *Synadenium grantii*. *Phytochemistry*, vol. 26. no. 11, p. 3041–3045.

VALADARES, MC., CASTRO, NC. and CUNHA, LC., 2007. *Synadenium umbellatum*: citotoxicidade e danos ao DNA de células da medula óssea de camundongos. *Rev. Bras. Ciênc. Farm.*, vol. 43, no. 4, p. 631–638.

Table 1. Effect of *Synadenium umbellatum* latex topically in excision wound healing model.

Treatment	%Wound contraction on day			Scar area (mm ²)
	7th	14th	21th	
Negative control (saline solution-0.9%)	21.9 ± 2.4	70.7 ± 4.2	79.7 ± 3.2	31.8 ± 6.57
Biocure-Biomembrane of <i>H. brasiliensis</i>	23.6 ± 3.6	77.9* ± 1.3	96.4* ± 2.5	4.4* ± 1.50
<i>S. umbellatum</i> latex (50 mg/animal/day topically)	19.8 ± 5.8	79.1* ± 4.2	97.4* ± 2.7	3.2* ± 1.30

Values are mean ± SD (n = 5).

* P < 0.05 when compared to negative control.

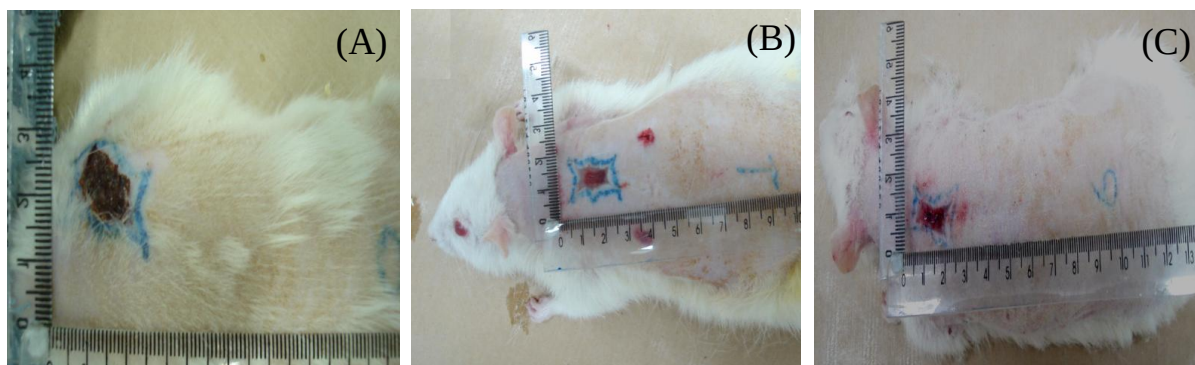


Figure 1. Experimental wound area on day 21. (A) Negative control (0.9% saline-solution), (B) Biomembrane of *H. brasiliensis* (Biocure) and (C) *S. umbellatum* latex (50 mg/animal/day topically).

5 – CONCLUSÕES

No presente trabalho foram avaliadas as atividades mutagênica, antimutagênica, genotóxica, angiogênica e o potencial de cicatrização do látex da *Synadenium umbellatum* (SuL). Os resultados obtidos nos diversos ensaios biológicos, permitiram nos concluir:

SuL mostrou forte ação mutagênica, citotóxica, antimutagênica e ação moderada de anticitotoxicidade pelo teste do micronúcleo em medula óssea de camundongo.

Foi observada a atividade angiogênica do SuL pelo ensaio da membrana corio-alandóidea do ovo embrionado de galinha.

Observou-se também que o SuL aumentou a velocidade de cicatrização em ferida limpa em dorso de rato.

6 - ANEXOS



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DO DESPORTO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
SECRETARIA DE COMISSÕES

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA MÉDICA HUMANA E ANIMAL DO
HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
CEPMHA-HC/UFG.**

Declaramos que recebemos para análise e parecer ético, o projeto de pesquisa sob a coordenação de:

Biom. Paulo Roberto de Melo Reis

Título: Avaliação das atividades angiogênica /
anti-angiogênica e mutagênica / antimuta-
gênica de látex extraído da Smadenium um-
bellatum.

Data de Entrada no CEPMHA-HC/UFG: 18 / 03 / 2008

Número do Protocolo no CEPMHA-HC/UFG

037 / 2008

- O número do protocolo é o controle da pesquisa neste Comitê, solicitamos que o mesmo seja mencionado em todos os documentos referentes a pesquisa, bem como em caso de solicitação de informações sobre o estudo.

Marlene R. Ferreira
Marlene Rodrigues Ferreira
Secretária do CEPMHA-HC/UFG
Coordenadora da Secretaria de Comissões
Hospital das Clínicas/UFG

Aprovação no Comitê de Ética.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DO DESPORTO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
HOSPITAL DAS CLÍNICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA MÉDICA HUMANA E ANIMAL

PROTOCOLO CEPMHA/HC/UFG N.º 037/2008

Goiânia, 26/06/2008

INVESTIGADOR (A) RESPONSÁVEL (IES): Dr. Paulo Roberto de Melo Reis

TÍTULO: "Avaliação das atividades angiogênica/anti-angiogênica e mutagênica/antimutagênica do látex extraído da Synadenium Umbellatum"

Área Temática: Grupo III

Área de Conhecimento: Ciências Biológicas - Genética

Local de Realização: Universidade Federal de Goiás – Depto. de Biologia Geral/ICB

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa Médica Humana e Animal do Hospital da Clínicas da Universidade Federal de Goiás, após análise e atendimento à adequação solicitada, **aprovou**, o projeto de Pesquisa acima referido, juntamente com os documentos apresentados e estes foram considerados em acordo com os princípios éticos vigentes.

- Informamos que não há necessidade de aguardar o parecer da CONEP- Comissão Nacional de Ética em Pesquisa para iniciar a pesquisa.
- O pesquisador responsável deverá encaminhar ao CEPMHA/HC/UFG, relatórios trimestrais do andamento da pesquisa, encerramento, conclusão(ões) e publicação(ões).
- O CEPMHA/HC/UFG pode, a qualquer momento, fazer escolha aleatória de estudo em desenvolvimento para avaliação e verificação do cumprimento das normas da Resolução 196/96 (*Manual Operacional Para Comitês de Ética em Pesquisa – Item 13*)


Farm. José Mário Coelho Moraes
Coordenador do CEPMHA/HC/UFG

Comunicação de Aceite de publicação Brazilian Journal of Biology:

Manuscrito: **Angiogenic activity of *Synadenium umbellatum* PAX**

--- Em **qua, 7/1/09**, **Brazilian Journal of Biology** <bjb@bjb.com.br> escreveu:

De: Brazilian Journal of Biology <bjb@bjb.com.br>

Assunto: Aceitação BJB-096/08

Para: chenleego@yahoo.com.br

Data: Quarta-feira, 7 de Janeiro de 2009, 16:58

Prezado(a) Autor(a) Dr.(a) **Lee Chen Chen**

Pela presente, vimos informar-lhe que seu manuscrito (artigo científico) intitulado “**Angiogenic activity of *Synadenium umbellatum* PAX**” foi aceito em 05/01/09 no Brazilian Journal of Biology.

Data **prevista** para publicação: fevereiro de 2010, ou seja, volume 70.1

Atenciosamente

Profa. Dra. Takako Matsumura Tundisi

Editora Chefe

Brazilian Journal of Biology