

16º Congresso Nacional de Iniciação Científica

**TÍTULO:** ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DO OLEORESINA DE COPAIFERA DUCKEI EM LINHAGEM CELULAR DERIVADA DE CARCINOMA GÁSTRICO

**CATEGORIA:** CONCLUÍDO

**ÁREA:** CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SAÚDE

**SUBÁREA:** BIOMEDICINA

**INSTITUIÇÃO:** UNIVERSIDADE DE FRANCA

**AUTOR(ES):** MIRIAN OLIVEIRA GOULART, ADRIANA LARA ANDRADE PINTO

**ORIENTADOR(ES):** RAQUEL ALVES DOS SANTOS

**COLABORADOR(ES):** ALINE OLIVEIRA CUNHA, SÉRGIO RICARDO AMBRÓSIO

Realização:

**SEMESP**   
sindicato das mantenedoras de ensino superior

Apoio:

 **ENIAC**  
ISO 9001  
Educação Básica e Superior

## **ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DO OLEORESINA DE *Copaifera duckei* EM LINHAGEM CELULAR DERIVADA DE CARCINOMA GÁSTRICO**

Mirian Oliveira Goulart; Adriana Lara Andrade Pinto; Aline Oliveira Cunha; Sérgio Ricardo Ambrósio; Raquel Alves dos Santos

Universidade de Franca, Avenida Dr. Armando Salles de Oliveira, 201 – Parque Universitário, 14404-600, Franca, São Paulo, Brasil

### **1. RESUMO**

O câncer gástrico é considerado um dos maiores causadores de morte no Brasil, sendo o segundo maior causador de óbitos e o quinto tipo de neoplasia mais comum. Tem como principal fator de risco a alimentação, entretanto existem evidências de que a bactéria *Helicobacter pylori* esteja associada com este tipo de câncer. Para se prevenir desta doença além de uma dieta saudável, grande parte da população utiliza para seu benefício substâncias naturais, dentre essas se destaca o oleoresina de copaíba, muito utilizado na medicina popular por possuir várias finalidades terapêuticas assim como: anti-inflamatória, germicida, potencial antisséptico, antitumoral, diurético, cicatrizante, sendo indicado contra o reumatismo, pneumonia, picada de cobra, cefaleia, hemorragia, urticárias, estimulante entre outros. O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação do oleoresina de *Copaifera duckei* sobre a proliferação das células tumorais de câncer gástrico (ACP01). Para testar a sua ação sobre as células de tumor gástrico foram realizados os ensaios XTT, BrdU e de sobrevivência clonogênica. Pelo ensaio XTT foram obtidos os menores valores de viabilidade celular nas concentrações de 62,5, 125, 250, 500 e 1000 µg/mL. No ensaio de BrdU, a proliferação celular foi significativamente reduzida nas concentrações de 50 e 100 µg/mL, enquanto que apenas a concentração de 100 µg/mL reduziu significativamente a fração de sobrevivência. Os resultados demonstraram que o oleoresina apresenta atividade citotóxica e antiproliferativa sobre a linhagem celular aqui testada, no entanto, estudos futuros devem ser realizados a fim de se obterem mais informações sobre o mecanismo de ação pelo qual ele exerce sua atividade.

Palavras chave: *Copaifera duckei*, oleoresina, cancer gástrico, proliferação celular  
Apoio Financeiro: FAPESP (2011/13630-7), PIBIC/CNPq

### **2. INTRODUÇÃO**

A palavra câncer vem do grego Korkinos (caranguejo) e é definida como o conjunto de doenças que possuem o crescimento desordenado das células, que invadem

outros tecidos ou órgãos vizinhos, podendo levar o indivíduo ao óbito rapidamente, sendo o seu desenvolvimento e a sua progressão o resultado do acúmulo de diferentes alterações genéticas e epigenéticas. Entre os fatores etiológicos do câncer estão a exposição a substâncias químicas, vírus, os fatores comportamentais, exposição às radiações, bem como a ocorrência de mutações genéticas (1,2).

O câncer gástrico é um dos maiores causadores de morte no mundo, sendo assintomático em sua fase inicial, dificultando assim seu diagnóstico precoce, porém, quando diagnosticado na sua fase inicial, as chances de cura são altas (3).

De acordo com a literatura, as agressões sofridas na mucosa gástrica pelo consumo de sal e ingestão de alimentos em temperatura elevada, pode facilitar a invasão da bactéria *Helicobacter pylori*, levando à gastrite crônica e assim aumento na suscetibilidade ao desenvolvimento do câncer gástrico (3).

A participação da bactéria *Helicobacter pylori* na carcinogênese gástrica, ocorre das mais variadas formas, podendo causar gastrite crônica, por suprimir a defesa do hospedeiro e assim induzir a produção de agentes mutagênicos e promover a proliferação celular, sendo que quanto mais prolongada a infecção, maior será a probabilidade de reparações inadequadas, mutações e conseqüentemente o aparecimento do câncer gástrico (3,4).

O câncer gástrico é considerado um dos maiores causadores de morte no Brasil, sendo o estado do Pará um dos mais afetados por essa doença (5). Além disso, é a segunda maior causa de mortes por câncer e o quinto tipo de neoplasia mais comum, acometendo mais homens do que mulheres (1,6). O principal fator de risco é a alimentação e este tipo de câncer é mais prevalente em homens por volta dos 70 anos de idade (1). Alguns estudos já comprovaram que 65% dos pacientes diagnosticados com essa doença têm mais de 50 anos de idade, sendo que pessoas com menos de 45 anos tem uma melhor taxa de sobrevivência após a doença (1,7).

O tratamento do câncer gástrico pode ser feito de três formas: quimioterapia, radioterapia e cirurgia, com o objetivo de cura, prolongamento ou ainda melhora na qualidade de vida. Essas estratégias terapêuticas podem ser usadas em conjunto, variando apenas quanto à suscetibilidade dos tumores (1). Apesar dos grandes avanços no diagnóstico e tratamento do câncer gástrico, a sobrevivência geral em 5 anos para os pacientes com essa neoplasia ainda é insatisfatória em virtude, principalmente, da heterogeneidade genética e da multirresistência às drogas

tornando-se assim interessante a busca por novas substâncias com potencial antitumoral para esse tipo de neoplasia (8).

Assim, o oleoresina das espécies do gênero *Copaifera*, tem sido utilizado para várias finalidades terapêuticas assim como: anti-inflamatória, germicida, antisséptica, antitumoral, diurética, cicatrizante, e ainda indicada contra o reumatismo, pneumonia, picada de cobra, cefaleia, hemorragia, urticárias e estimulante (9,10,11).

Alguns pesquisadores já testaram a eficiência deste óleo em vários tipos de câncer, com o objetivo de comprovar ou adaptá-lo a novas terapias, e obtiveram resultados satisfatórios, entretanto uma substância para ser considerada interessante para os estudos precisa ser seletiva, por exemplo, se a substância de estudo destruir todas as linhagens de células cancerosas, ela já é descartada, pois se ela mata todas essas células, provavelmente ela irá destruir células normais, e desta forma se torna inviável (12).

### **3. OBJETIVOS**

Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade antiproliferativa do oleoresina de *Copaifera duckei* na linhagem celular ACP01, derivada de carcinoma gástrico.

### **4. METODOLOGIA**

Cultivo celular e tratamentos

Os ensaios foram realizados na linhagem derivada de tumor gástrico ACP01, gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Rommel Mario Rodriguez Burbano da Universidade Federal do Pará. Após o descongelamento, as células foram cultivadas em meio de cultivo contendo DMEM +HAM F10 (Sigma-Aldrich), acrescentado de 10% de soro fetal bovino estéril (Sigma-Aldrich), 1% da mistura de antibióticos penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich) e 0,2% de sulfato de canamicina (Sigma-Aldrich). Durante o período de cultivo e tratamento, as células foram mantidas na estufa à 37 °C, em estufa úmida com saturação de CO<sub>2</sub> a 5%.

Todos os tratamentos foram realizados a partir de uma solução estoque do oleoresina de *Copaifera duckei*, gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Sérgio Ricardo Ambrósio, do Grupo de Pesquisa em Produtos Naturais da Universidade de Franca. O oleoresina foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) permanecendo em uma concentração padrão de 25.000 µg/mL, o qual foi usado para as diluições de tratamento. Como controle solvente foi utilizado DMSO na concentração final máxima de 1% em meio de cultivo.

Como controle positivo, foi utilizado cloridrato de doxorubicina (Sigma-Aldrich) na concentração de 0,5  $\mu\text{M}$ .

Ensaio colorimétrico do XTT, este teste colorimétrico tem por função avaliar a atividade mitocondrial das células, ou seja, é usado para indicar a viabilidade celular, pois as enzimas mitocondriais das células viáveis reduzem o sal de tetrazólio em formazana, formando um sal insolúvel, que pode ser quantificado por espectrofotometria. Foram semeadas 10.000 células por poço em uma placa de 96 poços, e feita a incubação por 24 horas a 37 °C. Após esse período foi realizado o tratamento com o oleoresina de *C. duckei*, onde foram testadas as seguintes concentrações: 7,8  $\mu\text{g/mL}$ , 15,6  $\mu\text{g/mL}$ , 31,2  $\mu\text{g/mL}$ , 62,5  $\mu\text{g/mL}$ , 125  $\mu\text{g/mL}$ , 250  $\mu\text{g/mL}$ , 500  $\mu\text{g/mL}$ , 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Como controle positivo foi utilizado DMSO a 10% (v/v), como controle solvente DMSO 1% (v/v) e ainda o controle negativo que não recebeu nenhum tratamento.

Após 24 horas do tratamento, o experimento foi finalizado da seguinte forma: descartou-se o meio da placa, lavando-a uma vez com tampão salino fosfato (PBS) não estéril; em seguida, adicionaram-se 100  $\mu\text{L}$  da solução de XTT em cada poço, sendo esta preparada em meio de cultivo DMEM sem fenol vermelho a partir das recomendações do fabricante (Roche, Mannheim). As placas foram levadas para a estufa 37°C protegidas da luz, permanecendo incubadas por 4 horas. Em seguida, foi realizada a leitura no espectrofotômetro (leitor de microplacas-Tecan A-5082, Salzburg, Áustria) usando o comprimento de onda de 492 nm e o valor de referência de 690 nm. A viabilidade celular foi calculada em comparação ao controle negativo considerado com 100% de viabilidade (13).

Ensaio de BrdU: Este teste colorimétrico permite a análise quantitativa da proliferação celular *in vitro* baseado na incorporação do 5-Bromo -2-deoxiuridina (BrdU), sendo um análogo da timidina na molécula de DNA.

Para este ensaio foram semeadas  $1 \times 10^4$  células por poço em placas com 96 poços, que posteriormente foram mantidas por 24 horas em estufa a 37 °C. Após esse período foi realizado o tratamento com *C. duckei* nas seguintes concentrações: 6,25  $\mu\text{g/mL}$ , 12,5  $\mu\text{g/mL}$ , 25  $\mu\text{g/mL}$ , 50  $\mu\text{g/mL}$ , 100  $\mu\text{g/mL}$ . Como controle positivo foi utilizado cloridrato de doxorubicina (0,5  $\mu\text{M}$ ), como controle solvente DMSO a 1%, e ainda o controle negativo não recebeu nenhum tratamento. A proliferação celular foi determinada 24 h após os tratamentos por meio da utilização do Cell Proliferation Elisa BrdU (Roche Applied Science), baseado na quantificação da incorporação de

bromodeoxiuridina (BrdU) por meio de um substrato a base de peroxidase. Após os tratamentos realizados conforme descrito acima, foi realizada a lavagem das células com solução de Hanks e reincubação das mesmas em meio de cultivo completo acrescido de BrdU (10  $\mu$ M) por mais 90 minutos, quando então as culturas foram lavadas e tratadas com solução desnaturante, seguida da incubação com o substrato conforme as recomendações do fabricante. Finalmente, foi realizada a leitura colorimétrica em espectrofotômetro (370-492 nm), sendo então determinada a proporção de células em proliferação em razão das medidas de absorbância (14).

#### Ensaio de sobrevivência clonogênica

Este ensaio é considerado uma ferramenta básica, pois determina a capacidade que uma célula tem de se proliferar, retendo a sua capacidade de reprodução formando colônias. A curva de sobrevivência é feita baseada na relação entre a dose do agente utilizado para produzir um insulto e a quantidade de células que mantém a capacidade de reprodução.

Neste ensaio foram semeadas 500 células por poço, em placas de 6 poços. Esses cultivos foram mantidos em estufa à 37 °C e após 3 horas exatas foi realizado o tratamento das células com as seguintes concentrações de oleoresina: 6,25 $\mu$ g/mL, 12,5 $\mu$ g/mL, 25 $\mu$ g/mL, 50 $\mu$ g/mL, 100 $\mu$ g/mL. Como controle positivo foi utilizado cloridrato de doxorrubicina (0,5  $\mu$ M), como controle solvente DMSO a 1%, e ainda o controle negativo não recebeu nenhum tratamento. Terminado este procedimento a placa então é levada a estufa à 37 °C permanecendo por 24 horas. Em seguida, foi feita a lavagem dos poços com PBS e em seguida acrescido meio de cultivo completo em cada poço. As placas foram então incubadas em estufa 37 °C por um período de 7 dias.

Após este período, o meio de cultivo das placas foi descartado e as mesmas lavadas com PBS (1X). Em seguida as células foram fixadas por 30 minutos com 2 mL de solução fixadora (metanol:ácido acético:H<sub>2</sub>O na proporção 1:1:8, v/v/v). Após esse tempo, as placas foram delicadamente lavadas com 2 mL de água destilada e foram acrescentados 3 mL de corante Giemsa diluído em tampão Sorensen (1:19, v/v). Após 15 minutos o corante foi descartado e as placas lavadas com água destilada. As colônias foram contadas e a fração de sobrevivência calculada considerando-se o controle negativo como 100 % de sobrevivência.

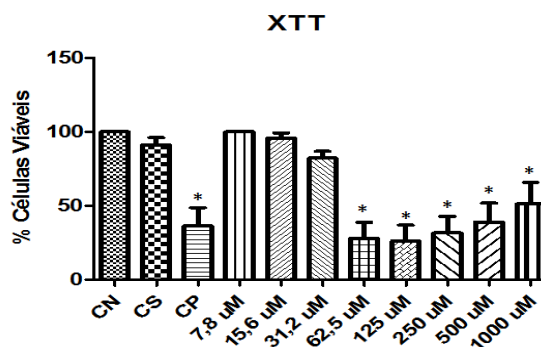
## 5. DESENVOLVIMENTO

Todos os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Genética e Biologia Molecular da Universidade de Franca. Para cada ensaio, foram realizadas, pelo menos, três repetições experimentais. A análise estatística foi feita por meio do *software* GraphPad (5.0) usando o teste estatístico de Dunnet com nível de significância de 0.05.

## 6. RESULTADOS

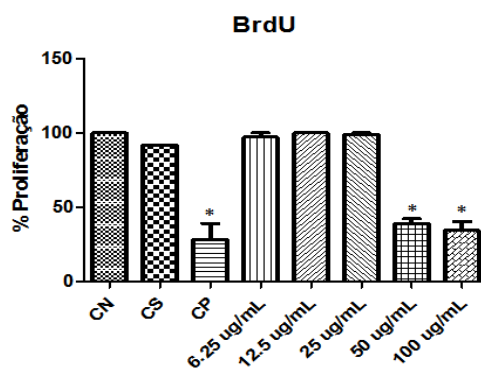
Os resultados mostrados a seguir se referem aos obtidos pelos ensaios colorimétricos de XTT, BrdU e de sobrevivência clonogênica

No ensaio de XTT, as células foram tratadas com oleoresina de *C. duckei* nas seguintes concentrações 7,8; 15,6; 31,2; 62,5; 125; 250; 500 e 1000 µg/mL, como mostra a figura 1. Foi observado que houve uma redução estatisticamente significativa em relação ao controle negativo, na porcentagem de viabilidade celular das culturas tratadas com as concentrações de 62,5; 125; 250; 500 e 1000 µg/mL ( $P < 0,05$ ).



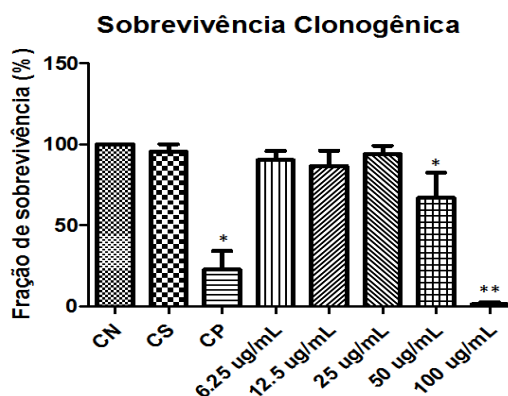
**Figura 1.** Porcentagem de células viáveis após 24 horas de tratamento com diferentes concentrações de oleoresina de *C. duckei*. CN: controle negativo; CS: controle solvente (DMSO 1%); CP: controle positivo (DMSO 10%). \* $p < 0,05$  em relação ao CN.

Considerando o ensaio BrdU (Figura 2), onde as células de câncer gástrico foram cultivadas e posteriormente tratadas com oleoresina de *C. duckei* nas concentrações de 6,25 ;12,5; 25; 50 e 100 µg/mL, é possível observar que nas concentrações de 50 e 100 µg/mL houve uma menor taxa de proliferação celular em relação ao o controle negativo ( $p < 0,05$ ).



**Figura 2.** Porcentagem de células proliferação após 24 horas de tratamento com diferentes concentrações de oleoresina de *C. duckei*. CN: controle negativo; CS: controle solvente (DMSO 1%); CP: controle positivo (Doxorrubicina 0,5  $\mu$ M). \* $p < 0,05$  em relação ao CN.

No ensaio de sobrevivência clonogênica (Figura 3) foi observado que quando as células foram tratadas nas concentrações de 6,25; 12,5; 25; 50  $\mu$ g/mL, a fração de sobrevivência foi maior em comparação com o controle positivo ( $P < 0,05$ ), entretanto o tratamento com a concentração de 100  $\mu$ g/mL levou a uma redução significativa na fração de sobrevivência, quando comparada ao controle negativo ( $P < 0,05$ ).



**Figura 3:** Fração de sobrevivência após 24 horas de tratamento com diferentes concentrações de oleoresina de *C. duckei*. CN: controle negativo; CS: controle solvente (DMSO 1%); CP: controle positivo (Doxorrubicina 0,5 $\mu$ M). \* $p < 0,05$  em relação ao CN.



No presente estudo, a atividade antiproliferativa do oleoresina de *C. duckei* foi testada em uma linhagem tumoral derivada de um isolado clínico de câncer gástrico. Para avaliar essa atividade, foram realizados os ensaios XTT, BrdU e de sobrevivência clonogênica.

Em linhas gerais o ensaio XTT tem por função indicar a viabilidade celular, o BrdU tem a função de avaliar a proliferação celular e a sobrevivência clonogênica determina a capacidade que uma célula tem de se proliferar, retendo a sua capacidade de reprodutiva evidenciada pela formação de colônias.

O primeiro teste realizado foi o XTT, cujos resultados obtidos mostraram que os tratamentos realizados com concentrações de oleoresina acima de 62,5 µg/mL reduziram significativamente a viabilidade celular. Assim também, o ensaio BrdU, cujo o objetivo foi analisar a proliferação celular, mostrou que os tratamentos com concentrações acima de 50 µg/mL, reduziram significativamente a taxa de proliferação celular da linhagem ACP01, quando comparado ao controle negativo. Apesar dos ensaios não-clonogênicos para avaliação da citotoxicidade, como a viabilidade, proliferação e sobrevivência celular, medirem o potencial de um agente citotóxico, esses ensaios de curta duração podem subestimar a citotoxicidade real em comparação aos ensaios de longa duração para eficiência de clonagem e crescimento. Assim também, esses mesmos ensaios podem ao mesmo tempo superestimar a citotoxicidade por não permitirem estimar células com danos reversíveis ou ainda resistentes ao agente citotóxico testado. Portanto, o uso de vários parâmetros não clonogênicos para avaliação de citotoxicidade reduzem os erros, mas não os elimina de vez. Por essas razões torna-se sensato a inclusão de parâmetros de avaliação clonogênica em estudos *in vitro*. O ensaio de sobrevivência clonogênica mede os efeitos citostáticos de longa duração de um determinado agente teste, por meio da medida da capacidade proliferativa de uma única célula formar um clone e assim produzir uma colônia viável (15).

Dessa forma, foi realizado o ensaio de sobrevivência clonogênica, o qual demonstrou redução na fração de sobrevivência para células tratadas com a concentração de 100 µg/mL, testada nas células de câncer gástrico em relação ao controle negativo, notamos que esta teve uma menor taxa de sobrevivência, ou seja, esta conseguiu destruir uma grande quantidade de células, tendo uma menor porcentagem de sobrevivência celular.

Santos Jr e cols. (2010) avaliaram a capacidade citotóxica do óleo-resina da espécie *C. langsdorffii* e de extratos de outras espécies nativas e exóticas do Brasil frente a quatro linhagens celulares tumorais (B16, HL-60, MCF-7 e HCT-8). Eles ainda consideraram que elevada atividade citotóxica do óleo-resina de *C. langsdorffii* sobre as células MCF-7 poderia ser atribuída ao ácido caurenóico, um dos diterpenos majoritários constituintes do óleo-resina extraída desta espécie.

Embora pouco se conheça sobre a atividade antitumoral do óleo-resina de *Copaifera* e de seus metabólitos secundários, a literatura demonstra que estudos científicos *in vitro* e *in vivo* estão em progresso e já comprovam que o óleo-resina apresenta ação inibitória no crescimento de tumores em estudo sobre o efeito do óleo em tumores induzidos pelo modelo carcinógeno DMBA e frente ao melanoma de murino (B16F10), assim como apresenta atividade antineoplásica frente a um carcinoma induzido pela linhagem celular epidermóide bucal e à linhagem Sp2/0 (mieloma de camundongo). Seu efeito também foi analisado sobre o tumor de Walker 256, não apresentando citotoxicidade para essa linhagem (8,17).

## **7. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os resultados demonstraram que o óleo-resina apresenta atividade citotóxica e antiproliferativa sobre a linhagem celular aqui testada, no entanto, estudos futuros devem ser realizados a fim de se obter mais informações sobre o mecanismo de ação pelo qual ele exerce sua atividade.

## **8. FONTES CONSULTADAS**

- 1- Ministério da saúde, Instituto Nacional de Câncer (INCA):ABC do câncer.Abordagens básicas para o controle do câncer. 2ª ed, Rio de Janeiro; 2012 ,1-129.
- 2- Pontes TB, Chen ES, Gigek CO, Calcagno DQ, Wisnieski F, Leal MF et al. Reduced mRNA expression levels of MBD2 and MBD3 in gastric carcinogenesis. *Tumor Biol*;2014;3447-3453.
- 3- Britto AV. Câncer de estômago: fatores de risco. *Cad. Saúde Públ.* 1997;13(Supl. 1):7-13.
- 4- Escuissato DL, Ledesma JA, Urban LABD, Liu CB, Filho JSR, Filho AGO et al. Metástase de câncer gástrico simulando neoplasia primária de pulmão – relato de caso e revisão da literatura. *Radiol Bras*;2002 ;35(2): 121 -124.
- 5- Resende ALS, Mattos IE , Koifman S. Mortalidade por câncer gástrico no estado do Pará, 1980-1997. *Arq Gastroenterol* ;2006;v. 43 – nº3:247 -52.

- 6- Campos ECR ,Pinheiro EBA, Baldissera RL, Kamei DJ,Santos FMR, Guedes A et al. Análise de fatores prognósticos no tratamento cirúrgico do câncer gástrico. Rev. Med. Res;2012 v.4, n.2, p. 101-107.
- 7- Guzmán M, Mercado V, Castillo L, Ríos G, Rodríguez G , Prognostic factors for survival in patients with resectable advanced gastric adenocarcinoma. 2016:1-8.
- 8 - Valdir F, Júnior V, Pinto AC;The copaifera genus: This review details the history, chemistry and pharmacology of the *Copaifera* L. genus (Leguminosae - Caesalpinoideae), including copaiba oils. 2002.Quim. Nova, Vol. 25, nº 2: 273-286.
- 9 - Pieri FA, Mussi MC, Moreira MAS, Óleo de copaíba (*Copaifera* sp.): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais.2009.Rev. Bras. Pl. Med. v.11, n.4:465-472.
- 10 - Gebara J, Barbosa AP, Azevedo IMG , Gimenez BO; Population Structure And Production Of Copaiba Oleoresin Between Valleys And Hillsides Of The Mining Area Oftrombetas River Pará ; Revista Árvore, Viçosa-MG;2016; v.40, n.1:699-705.
- 11- Rodriguesa ECR, Rodriguesa AMF, Vilhenab JCE, Almeida F B, Cruza RAS, Florentinoc AC et al.Development of a larvicidal nanoemulsion with Copaiba (*Copaifera duckei*) oleoresin; Rev Bras Farmacogn 24(2014): 699-705.
- 12- Sugimoto L ;Óleo de copaíba é testado em 9 tipos de câncer;Campinas ;2003: 5.
- 13- Roche , Kit cell proliferation XTT( colorimetric).
- 14- Roche , Kit cell proliferation ELISA , BrdU (colorimetric).
- 15- Sumantran, V. N. Cellular Chemosensitivity Assays: An Overview. In: Cancer Cell Culture: Methods and Protocols;2011 v. 731: 219-236.
- 16- Santos Júnior HM1, Oliveira DF, Carvalho DA, Pinto JM, Campos VA, Mourão AR, et al. Evaluation of native and exotic Brazilian plants for anticancer activity. 2010.J Nat Med.;64(2):231-8.
- 17-Botelho NM, Teixeira RKC, Yamaki VN, Silveira EL. Efeito do óleo de copaíba intravaginal no tumor de Walker 256 inoculado na vagina e útero de ratas. Rev Para Med;2012;26(3):7-15.