

EFEITO DO ÓLEO DE COPAÍBA INTRAVAGINAL NO TUMOR DE WALKER 256 INOCULADO NA VAGINA E ÚTERO DE RATAS¹

THE EFFECT OF COPAIBA OIL INTRAVAGINAL ON WALKER 256 CARCINOMA INOCULATED INTO THE VAGINA AND UTERUS OF FEMALE RATS

Nara Macedo BOTELHO²; Renan Kleber Costa TEIXEIRA³; Vitor Nagai YAMAKI³ e Edvaldo Lima SILVEIRA⁴

RESUMO

Objetivo: verificar os efeitos do óleo de copaíba por via intravaginal no tumor de Walker 256 inoculado na vagina e útero de ratas. **Método:** o tumor de Walker 256 foi inoculado na vagina e útero de 20 ratas, e estas distribuídas em dois grupos (n=10), no grupo controle (GC) os animais foram tratados com água destilada intravaginal na dose de 0,3mL e o grupo copaíba (GCO), tratados com óleo de copaíba na dose de 0,3mL intravaginal. Analisou-se a variação de peso do animal, peso e volume tumoral, potencial de inibição (PI), além da análise histológica da vagina, útero e reto dos animais. **Resultados:** a média da variação de peso no grupo controle foi 11,44 ±8,03g e no grupo copaíba 10,88 ±3,48g, não houve diferença estatisticamente significativa (p=0,83). No grupo controle o peso médio do tumor foi de 2,4 ±1,22 g e o volume de 2,52 ±1,41 mL e no grupo copaíba o peso médio de 2,31 ±0,88g e o volume médio de 2,36 ±1.13 mL. O potencial de inibição do óleo de copaíba por via intravaginal foi de 4,74%. Não houve diferença em relação ao estudo histológico. **Conclusão:** o óleo de copaíba por via intravaginal não apresentou efeitos sobre o tumor de Walker 256, inoculado na vagina e útero de ratas, em relação ao peso do animal, peso e volume tumoral e características histológicas.

DESCRITORES: plantas medicinais, carcinoma 256 de Walker, copaíba, ratos.

INTRODUÇÃO

O câncer do colo do útero é o segundo tipo de câncer mais frequente entre as mulheres no mundo, com aproximadamente 500 mil casos novos por ano, sendo responsável pelo óbito de 230 mil mulheres por ano¹. No Brasil este é o terceiro câncer mais frequente nas mulheres perdendo apenas para o melanoma e o câncer de mama. Estimativas do Instituto Nacional do Câncer apontam, para o ano de 2012, que ocorram 17.540 casos novos de câncer do colo do útero, com um risco estimado de 17 casos a cada 100 mil mulheres.²

A realização do exame citopatológico é a principal estratégia adotada para o rastreamento do câncer do colo uterino no Brasil e no mundo^{3,4},

contudo a taxa de cobertura nacional não se encontra ainda satisfatória.⁵ Devido a essa falha na cobertura, muitos casos de câncer de colo de útero são identificados tardiamente, em fases disseminadas e/ou metastáticas do tumor, onde a quimioterapia é a principal opção terapêutica a ser utilizada nesses casos.⁷

Essa limitação terapêutica, associada a baixas taxas de cura em fases avançadas do tumor, estimulam a realização de pesquisa que visam a utilização de novas drogas para o tratamento deste.^{8,9}

O óleo de copaíba, planta medicinal da região amazônica, destaca-se atualmente no âmbito das políticas públicas da Organização Mundial de Saúde de incentivo a prática de plantas medicinais¹⁰,

¹ Trabalho realizado no Laboratório de Cirurgia Experimental da Universidade do Estado do Pará UEPA. Belém, Pará, Brasil

² Médica, Profa Dra do Curso de Medicina da Universidade do Estado do Pará-UEPA. Belém, Pará, Brasil

³ Discente de Medicina da Universidade do Estado do Pará- UEPA. Belém, Pará, Brasil

⁴ Médico, Prof Doutorando do Curso de Medicina da Universidade do Estado do Pará- UEPA. Belém, Pará, Brasil

sendo que esta apresenta, comprovadamente, efeitos anti-inflamatório e cicatrizante^{11, 12}, contudo seus efeitos anti tumorais ainda necessitam de maiores estudos.^{9, 13, 14}

O uso de tumores experimentais é uma forma de testar novas drogas, como o tumor de Walker 256, uma vez que é de

METÓDO:

Ética e animais

Todos os animais da presente pesquisa foram estudados segundo as normas da Lei federal nº 11.794 e os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Este foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade do Estado do Pará (UEPA).

Nesta pesquisa utilizou-se 20 ratas (*Rattus norvegicus*) Wistar, com idade de aproximadamente 120 dias e peso variando entre 200 a 250 gramas, oriundos do Biotério do Laboratório de Cirurgia Experimental da UEPA. Durante todo o experimento água e ração foram oferecidas *ad libitum*.

Em todas as 20 ratas foi realizado ooforectomia e depois de confirmado o anestro inoculou-se o tumor de Walker 256 na vagina e útero¹⁵. Então estes animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos de 10 animais cada:

- Grupo Controle (GC): os animais foram tratados com água destilada por meio da aplicação direta na vagina, na dose de 0,3 mL.

- Grupo Copaíba (GCO): os animais foram tratados com óleo de copaíba por meio da aplicação direta na vagina, na dose de 0,3 mL.

Anestesia e técnica operatória

Os animais foram anestesiados utilizando cloridrato de cetamina (70 mg/Kg) e cloridrato de xilazina (10 mg/Kg), por via intraperitoneal. Após a anestesia dos animais, realizou-se a epilação da região abdominal seguida de antisepsia da pele com álcool iodado

fácil manipulação e a regressão tumoral é pouco comum, além de existirem diversos modelos descritos na literatura.^{15,16,17,18}

Assim, o objetivo deste estudo é verificar os efeitos do óleo de copaíba por via intravaginal, no tumor de Walker 256 inoculado na vagina e útero de ratas.

tópico. A seguir foi realizada uma laparotomia mediana com três cm de extensão para abordagem dos ovários.

Realizou-se uma ligadura no pedículo do ovário, com fio de algodão 3-0, sendo seccionado logo acima da ligadura em relação ao ovário. A laparorráfia foi realizada em dois planos, o músculo-aponeurótico foi suturado com fio de nylon 4- e a pele com nylon 5-0.¹⁹

Após 21 dias da ooforectomia, colheu-se a citologia vaginal esfoliativa, sendo o material corado pelo método de Shorr-Harris e analisado à microscopia óptica, com finalidade de confirmar o anestro dos animais.²⁰ Após a confirmação, em todos os 20 animais, foi aplicado ácido acético a 10% na dose de 0,3 mL, para maximizar a inoculação todo tumor.

Um dia após a aplicação do ácido acético, os animais foram novamente anestesiados, e em seguida realizou-se a escarificação, com uma escovinha endocervical, e posteriormente foi realizado a inoculação de solução de 0,3mL contendo tumor de Walker 256, numa concentração de 2×10^6 células por mililitro.¹⁸

O tratamentos dos animais utilizando as substancias de acordo com cada grupo ocorreu três dias após a inoculação tumoral. Realizou-se a eutanásia dos animais no 12º dia após a inoculação tumoral, por meio de overdose dos anestésicos utilizados.

O peso inicial do animal e o peso no dia da eutanásia foi realiado para comparação posterior. Após a morte dos animais realizou-se uma laparotomia para abordagem da cavidade abdominal, em busca de metástases macroscópicas, além da ressecção da vagina, útero e reto dos animais.

Os órgãos ressecados, a exceção do intestino, foram pesados em conjunto e tiveram seus volumes mensurados por meio de uma bureta milimetrada com uma quantidade de líquido de 10 mL.

O volume da peça foi considerado pela variação do seu volume final e inicial. O peso tumoral dos animais do grupo estudo foi comparado com o peso dos animais controle, sendo o percentual de inibição (PI) calculado com base na fórmula de Tarnowisk e Stock²¹, onde o percentual de inibição é dado pela fórmula: $PI(\%) = 100 - (Tt \times 100)/Tc$, onde Tt é a média dos pesos tumoral do GCO e Tc é a média dos pesos tumorais do GC.

Após a mensuração do peso e volume da vagina e do útero, estes órgão

juntamente com o reto, foram conservados em formol tamponado à 10% e preparados em rotina de processamento histológicos, corado com Hematoxilina e Eosina. As peças foram analisadas em relação as camadas que o tumor infiltrava em: 0- ausente, 1- mucosa, 2- submucosa, 3- muscular e 4- adventícia.

Análise estatística

O teste ANOVA foi utilizado para comparar o peso e volume dos órgãos analisados. Adotou-se $p < 0,05$ para rejeitar a hipótese de nulidade. O teste de Exato de Fischer foi usado para comparar a análise estatística dos grupos e presença de necrose.

RESULTADOS:

No início do experimento a média de peso dos animais do GC foi de 224,33 g \pm 11,66 g, e na data da eutanásia de 212,89 \pm 9,23 g, correspondendo a uma perda média de 11,44 \pm 8,03 (5%) g. Em relação ao GCO, a média de peso inicial foi de 223,88 \pm 9,63 g, e ao final 213 \pm 9,86 g, apresentando uma variação de peso de menos 10,88 \pm 3,48 g (4,85%). A diferença descrita não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p=0,83$).

Quanto ao peso do tumor, no GC este foi de 2,4 \pm 1,22 g e o GCO de 2,31 \pm 0,88g. Em relação ao volume, no GC a média dos volumes foi de 2,52 \pm 1,41 mL e

no GCO de 2,36 \pm 1.13 mL. A descrição do peso e volume tumoral de cada animal está descrito na tabela 1.

Baseado na fórmula de Tarnowisk e Stock²¹, o potencial de inibição do óleo de copaíba por via intravaginal foi de 4,74%.

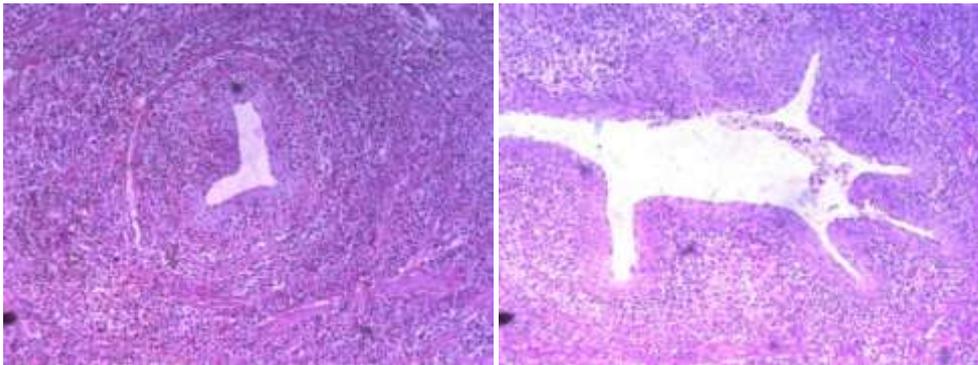
Em relação a análise histológica não houve diferença estatística entre os grupos, apresentando disseminação tumoral em todas as camadas do colo uterino (figura 1), vagina (figura 2) e reto (figura 3). Sendo que no GCO houve 8 animais com áreas de necrose no reto e no GC houve 6 animais, mas sem diferença estatística.

Tabela 1 – Descrição do peso e volume tumoral de cada animal de acordo com o grupo.

Animal	Grupo Controle		Grupo Copaíba	
	Peso tumoral (g)	Volume tumoral (mL)	Peso tumoral (g)	Volume tumoral (mL)
R1	1,30	1,20	1,68	1,80
R2	1,57	1,50	1,74	2,00
R3	1,88	2,00	1,97	2,00
R4	1,89	2,00	1,98	2,00
R5	2,22	2,00	2,30	2,50
R6	2,32	3,00	2,43	2,50
R7	2,35	2,50	2,52	2,80
R8	2,40	2,60	2,61	3,00
R9	2,61	2,50	2,65	2,80
R10	5,47	6,00	2,99	3,20
Média	2,40	2,53	2,28	2,46

FONTE: Protocolo de pesquisa

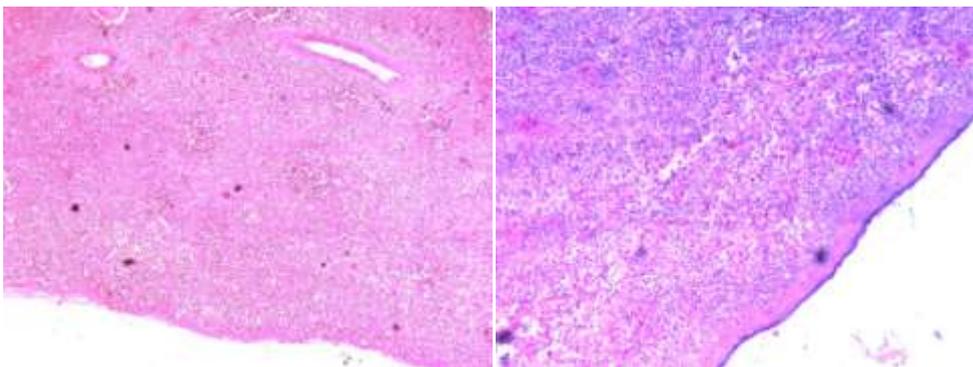
$p = 0,7695$ (peso tumoral) e $p = 0,8721$ (volume tumoral) (ANOVA)



Grupo Copaíba

Grupo Controle

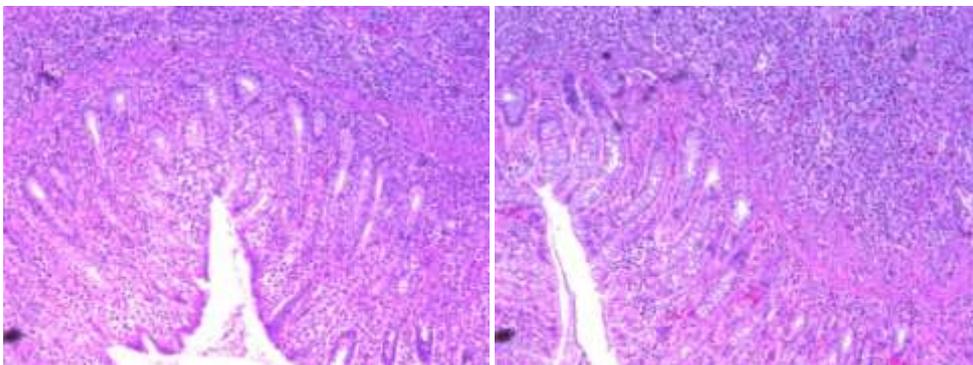
Figura 1 - Microscopia de corte histológico do colo de útero de ratas com tumor de Walker do Grupo Copaíba e Grupo Controle. Ambos com infiltração tumoral de padrão difuso atingindo todas as camadas, neoformação vascular e no centro o canal endocervical (HE – 40x)



Grupo Copaíba

Grupo Controle

Figura 2 – Microscopia de corte histológico de vagina de ratas com tumor de Walker do Grupo Copaíba e Grupo Controle. Ambos com infiltração tumoral de padrão difuso atingindo todas as camadas (H.E.- 40x)



Grupo Copaíba

Grupo Controle

Figura 3 – Microscopia de corte histológico do reto de ratas com tumor de Walker Grupo Copaíba e Grupo Controle. Ambos com invasão tumoral de todas as camadas e nas Bordas observa-se o epitélio glandular do reto (H.E.- 40x)

DISCUSSÃO:

Vários efeitos são atribuídos ao óleo de copaíba pela população, sendo que alguns desses foram comprovados cientificamente, a exemplo de seu efeito antiinflamatório e cicatrizante^{11, 12}, contudo seu efeito anti tumoral ainda não foi completamente esclarecido^{9, 13, 14}. Alguns estudos demonstraram que a ação do óleo de copaíba estão diretamente ligados a dose empregada, sendo que certos autores consideram este óleo com efeitos semelhantes ao dos glicocorticóides¹⁴.

Brito et al (2010)¹⁹ com metodologia semelhante, demonstrou que o óleo de copaíba por via oral, na dose de 4,8mL/Kg, estimulou o crescimento tumoral em cerca de 70%, estes autores acreditaram que o óleo apresentou nessa dose, efeito imunossupressor. Assim, esse estudo tentou verificar se utilizando o óleo de forma externa este poderia apresentar efeitos sobre o tumor sem produzir uma imunossupressão, sendo a forma intravaginal uma prática realizada pela população.

A análise do peso do animal e peso e volume tumoral é uma avaliação direta do estado clínico do animal²². Nesse estudo o óleo de copaíba não apresentou efeitos nesses parâmetros, mostrando que o óleo de copaíba pela via utilizada não influenciou o crescimento do tumor de Walker. Este fato pode ser confirmado pelo poder de inibição do óleo que foi de 4,74% não sendo essa uma diferença estatisticamente significativa.

Comprova-se ainda a baixa eficácia do tratamento com óleo de copaíba intravaginal a ausência de diferença

estatística entre os grupos em relação ao estudo histológico, onde todos os animais apresentaram infiltração total do tumor na vagina, útero e reto.

O óleo de copaíba por apresentar efeito dose-dependente em relação a sua propriedade antiinflamatória e imunossupressora deve ser utilizado em relativas baixas doses para não falsear seus efeitos antineoplásicos. Estudo de Lima et al,²³ utilizando óleo de copaíba na dose de 2g/Kg, encontrou uma redução de 58% no crescimento de melanoma em camundongos.

Este estudo mostra que a dose empregada não deve ser muito baixa para apresentar os melhores resultados do óleo, assim a quantidade empregada nesse estudo, devido à via empregada, não deve ter alcançado a dose ideal para inibir o desenvolvimento do tumor.

Novos estudos devem ser realizados buscando verificar se empregando uma dose maior ou por um período maior o óleo de copaíba apresentará efeitos no tumor.

Além disso, devem-se realizar estudos que identifiquem os princípios ativos do óleo que apresentem os efeitos antineoplásicos e imunossupressores para conhecer a ação destes isolados.

CONCLUSÃO:

O óleo de copaíba por via intravaginal não apresentou efeitos sobre o tumor de Walker 256 inoculado no útero e colo de ratas, em relação ao peso do animal, peso e volume tumoral e características histológicas.

SUMMARY

THE EFFECT OF COPAIBA OIL INTRAVAGINAL ON WALKER 256 CARCINOMA INOCULATED INTO THE VAGINA AND UTERUS OF FEMALE RATS

Nara Macedo Botelho; Renan Kleber Costa Teixeira; Vitor Nagai Yamaki e Edvaldo Lima Silveira

Objective: Evaluate the effects of copaiba oil intravaginally on the Walker 256 tumor inoculated into the vagina and uterus of rats. **Methods:** Was inoculated Walker 256 tumor in the vagina and uterus of 20 rats, they were divided into two groups (n = 10) in control group

animals were treated intravaginally with distilled water at a dose of 0.3 ml and the group copaiba, the animals was treated with copaiba oil at a dose of 0.3 ml intravaginally. Was analyzed the variation of body weight, and tumor's volume and weight and potential for inhibition of the oil. **Results:** The mean weight change in the control group was 11.44 ± 8.03 g and group copaiba 10.88 ± 3.48 g, there was no statistical difference ($p = 0.83$). In the control group the mean tumor weight was 2.4 ± 1.22 g and the volume of 2.52 ± 1.41 mL in group copaiba the average weight was 2.31 ± 0.88 g and the mean volume was 2.36 ± 1.13 mL. The potential inhibition of copaiba oil intravaginally was 4.74%. **Conclusion:** The copaiba oil intravaginally had no effect on the Walker 256 tumor inoculated into the vagina and uterus of rats, relative to the weight of the animal and the tumor volume and weight, and histological characteristy.

Key-words: Medical plants, Walker 256 carcinoma, copaiba, rats

REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. Comprehensive cervical cancer control: a guide to essential practice. Geneva: WHO; 2007
2. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer. Rio de Janeiro: INCA; 2012.
3. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Diretrizes Brasileiras para o Rastreamento do Câncer do Colo do Útero: atualização 2011. Rio de Janeiro: INCA; 2011.
4. Goncalves, CV; Sassi, RM; Netto, IO; Castro, NB; Bortolomedi, AP. Cobertura do citopatológico do colo uterino em Unidades Básicas de Saúde da Família. Rev. Bras. Ginecol. Obstet. 2011; 33(9): 258-63
5. Novaes, HMD; Braga, PE; Schout, D. Fatores associados à realização de exames preventivos para câncer nas mulheres brasileiras, PNAD 2003. Ciênc Saúde Coletiva. 2006;11(4):1023-35
6. Martins, LFL; Thuler, LCS; Valente, JG. Cobertura do exame de Papanicolaou no Brasil e seu fatores determinantes: uma revisão sistemática da literatura. Rev Bras Ginecol Obstet. 2005;27(8):485-92
7. Van Luijk, IF; Coens, C; Van Der Burg, ME; Kobierska, A; Namer, M; Lhomme, C; Zola, P; Zanetta, G; Vermorken, JB. Phase II study of bleomycin, vindesine, mitomycin C and cisplatin (BEMP) in recurrent or disseminated squamous cell carcinoma of the uterine cervix. Ann Oncol. 2007;18(2):275-81
8. Cannistra, SA; Niloff ,JM. Cancer of the uterine cervix. N Engl J Med. 1996;334(16):1030-7
9. Brito NMB, Brito MVH, Carvalho RKV, Matos LTMB, Lobato RC, Correa SC, Brito RB. The effect of copaiba balsam on Walker 256 carcinoma inoculated into the vagina and uterine cervix of female rats. Acta Cir. Bras. 2010; 25(2): 176-80
10. Akerele, O. Summary of WHO guidelines for assessment of herbal medicines. HerbalGram. 1993; 28:13-9
11. Brito, NMB; Simoes, MJ; Pessoa, AF; Melo, MCF. Efeitos do óleo de copaiba na cicatrização de feridas cultaneas abertas em ratos. Rev. Para. Med. 1998; 12(1): 28-32
12. Veiga Junior, VF; Rosas, EC; Carvalho, MV; Henriques, MG; Pinto, AC. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* and *Copaifera multijuga* Hayne: a comparative study. Journal of ethnopharmacology. 2007; 112(2):248-54
13. Gomes, NM; Rezende ,CM; Fontes, SP; Hovell, AMC; Landgraf, RG; Pinto, AC; Fernandes, PD. Antineoplastic activity of *Copaifera multijuga* oil and fractions against ascitic and solid Ehrlich tumor. Journal of ethnopharmacology. 2008; 119(1): 179-84
14. Souza-Júnior, OG; Damous, SHB; Lamarão, LG. Revisão crítica do uso médico do óleo de copaiba. Rev Para Med. 2000;14(1):71-6
15. Moraes, SP; Cunha, A; Reis Neto, JÁ; Barbosa, H; Roncolato, CAP; Duarte, RF. Modelo Experimental do tumor de Wlaker. Acta Cir Bras. 2000;15(4):252-61

16. Gomes Neto, A; Pessoa, BBGP; Aguiar, AS; Furtado, BM; Moraes, MO; Ribeiro, RA. Modelo de tumor de pulmão em ratos com o carcinoma de Walker. *Acta Cir Bras.* 2002;17(1):12-22
17. Silva, RFG; Soares, FSD; Anselmo, JNN; Fé, DMM; Cavalcante, JLBG; Moraes, MO e col. Modelo Experimental do carcinoma 256 de Walker em baxiga de ratos. *Acta Cir Bras.* 2002;17(1):62-6
18. Brito, NMB; Brito, MVH; Carvalho, RKV; Matos, LTMB; Veloso, TS; Vasconcelos, DM; Brito, RB. Experimental inoculation model of Walker 256 carcinoma into vagina and cervix uteri of female rats. *Acta Cir Bras.* 2007; 22(6): 495-8
19. Brito, NMB; Carvalho, RKV; Matos, LTMB; Lobato, RC; Brito, RB. The oophorectomy effect on Walker 256 tumor inoculated into the vagina and uterine cervix of female rats. *Acta Cir Bras.* 2009; 24(1): 26-9
20. Gronroos, M; Kauppila, O. Hormonal-cyclic in rats under normal conditions and under stress as revealed by vaginal smears after Shorr staining. *Acta Endocrinol.* 1959; 32: 261-71
21. Tarnowski, GS; Stock, CC. Effects of combinations of azaserine and 6-diazo-5-oxo-L-norleucine with purine analogs and other antimetabolites on the growth of two mouse mammary carcinomas. *Cancer Res.* 1957;17(10):1033-9
22. Tisdale, MJ. Cancer cachexia. *Curr Opin Gastroenterol.* 2010; 26(2): 146-51
23. Lima, SR; Junior, VF; Christo, HB; Pinto, AC; Fernandes, PD. In vivo and in vitro studies on anticancer activity of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. *Phytother Res.* 2003;17(9):1048-105

Endereço para correspondência

Nara Macedo Botelho
Centros de Ciências Biológicas e da Saúde – CCBS
Endereço: Trav. Perebebuí, 2623
Fone: 3276-2500/3276-7200
E-mail: narambotelho@gmail.com