

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



TESE

Avaliação de balanço oxidativo em cães com neoplasias mamárias e teste do óleo resina de copaíba como terapia adjuvante em ratos

Anelize de Oliveira Campello Felix

Pelotas, 2014

Anelize de Oliveira Campello Felix

Avaliação de balanço oxidativo em cães com neoplasias mamárias e teste do óleo resina de copaíba como terapia adjuvante em ratos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área do conhecimento: Sanidade Animal).

Orientador: Márcia de Oliveira Nobre

Pelotas, 2014

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

F317a Felix, Anelize de Oliveira Campello

Avaliação de balanço oxidativo em cães com neoplasias mamárias e teste do óleo resina de copaíba como terapia adjuvante em ratos / Anelize de Oliveira Campello Felix ; Márcia de Oliveira Nobre, orientadora. — Pelotas, 2014.

53f.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2014.

1. Câncer de mama. 2. cat. 3. Pon1. 4. Cães. 5. copaíba.
I. Nobre, Márcia de Oliveira, orient. II. Título.

CDD : 636.7

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Banca examinadora:

Dra. Flávia Aleixo Vasconcellos

Dra. Isabel Cristina Pereira

Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva

Profa. Dra. Cristina Gehver Fernandes

Aos animais, pois sem eles
nada disso faria sentido.

Agradecimentos

Agradeço à minha família, aos meus pais por me proporcionarem o caminho traçado até aqui, me apoiarem e serem meus esteios; à minha irmã pelo apoio desde sempre.

Ao Samuel, meu amigo, meu companheiro e grande responsável por eu chegar até o final. Eu te amo!

À minha orientadora, Márcia, por confiar em mim mais do que eu mesma.

Aos meus amigos e co-orientadores Éverton e Flávia, pelo apoio e experiência trocada.

Às minhas estagiárias “divas” (Fernanda, Andréia, Cláudia, Camilla e Fabiana), sem elas nada disso teria acontecido. Muito obrigada gurias!!!!

Aos colegas de pós graduação do CLINPET Mari, Dudu, Piti, Sabrina, Cici e Thiago, pela amizade dentro e fora dos limites acadêmicos. Valeu gurizada!!!

Aos graduandos do grupo, pelo auxílio e pelas intermináveis conversas nos intervalos de almoço na nossa sala. Obrigada crianças!!!

À equipe do Biotério Central-UFPel, que me recebeu tão bem e sempre me apoiou.

Às minhas amigas do CSA, que sempre me ouviram e foram a minha fuga nos momentos mais difíceis. Amigas para sempre!!!!

Por fim, agradeço aos animais, principalmente àqueles que se doaram para a realização do meu trabalho e pelos quais eu vou zelar e lutar sempre.

Muito obrigada!

“...Um dia me disseram
Que as nuvens não eram de algodão
Sem querer eles me deram
As chaves que abrem esta prisão

Quem ocupa o trono tem culpa
Quem oculta o crime também
Quem duvida da vida tem culpa
Quem evita a dúvida também tem...”

Engenheiros do Hawái

Resumo

CAMPELLO FELIX, Anelize de Oliveira. **Avaliação de balanço oxidativo em cães com neoplasias mamárias e teste do óleo resina de copaíba como terapia adjuvante em ratos.** 2014. 52f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O surgimento dos neoplasmas mamários bem como o estabelecimento das metástases está relacionado com uma série de fatores, dentre eles destaca-se a liberação de radicais livres. A paraoxanase é uma enzima produzida pelo fígado que é capaz de remover os produtos da peroxidação lipídica. O uso de substâncias consideradas antioxidantes vem sendo uma alternativa para o combate ao estresse oxidativo. A copaíba é uma planta usada com várias finalidades e atualmente autores atribuem a ela potencial antioxidante. O objetivo deste trabalho foi estabelecer o perfil oxidativo de cães portadores de tumor de mama e avaliar o uso do óleo resina de copaíba como terapia adjuvante no tratamento de modelos biológicos portadores de tumores mamários induzidos quimicamente. Foram coletadas amostras sanguíneas de 50 cães com tumores mamários, onde foi verificada a atividade da enzima PON1 e a capacidade antioxidante total (CAT). O uso do óleo resina de copaíba foi estudado em ratos Wistar com e sem tumores induzidos, nos quais foi avaliado os níveis de enzimas hepáticas e também a atividade da PON1. Foram também realizados testes de citotoxicidade *in vitro* com diferentes concentrações do óleo resina de copaíba. Foi possível observar que cães com tumor de mama apresentam redução na atividade da enzima PON1 e também na CAT. O óleo resina de copaíba apresentou capacidade de inibir o crescimento de linhagens celulares de tumor de mama, entretanto, este estudo não pode definir sua atividade no controle destes tumores *in vivo*.

Palavras chave: câncer de mama, CAT, PON1, cães, copaíba

Abstract

CAMPELLO FELIX, Anelize de Oliveira. **Assessing the oxidative balance of dogs with mammary tumours, and the use of copaiba oil as an adjuvant therapy in the rat model of the disease** 2014. 52f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The occurrence of mammary tumors, as well as metastatic establishment, is associated with a series of factors, foremost among which are free radicals. Paraoxanase is an enzyme produced by the liver, capable of removing by products of lipid peroxidation. The use of antioxidant substances is becoming an alternative measure in combating oxidative stress. Copaiba oil is used for various medical reasons, and it is believed to have antioxidant potential. In this light, this study assesses the oxidative profile of dogs suffering from mammary tumors, and evaluates the viability of using copaiba oil as an adjuvant in treating this disease. Blood samples from 50 dogs with mammary tumors were obtained and PON1 activity and total antioxidant capacity (TAC) assessed. The use of copaiba oil was also assessed regarding its safety and action in a rat model for mammary tumors. PON1 activity and hepatic function was also assessed. Furthermore, copaiba oil was assessed in vitro regarding its toxicity in normal or cancerous cell lines. Dogs with mammary tumors had lower levels of PON1 activity than healthy peers, and the TAC was directly correlated. Copaiba oil did inhibit cancerous cell growth in vitro, but this study could not determine its effects in tumors in vivo.

Keywords: breast cancer, CAT, PON1, dogs, copaíba

Lista de figuras

ARTIGO 1

Figura 1: Atividade da PON 1 em cães com Tumores Mamários Múltiplos, Tumores Mamários Simples e animais hígidos	27
Figura 2: Atividade de PON 1 em cães com diferentes tipos de tumor de mama.....	27
Figura 3: Capacidade antioxidante total (CAT) em cães com diferentes tipos de tumor de mama.....	28
Figura 4: Correlação entre atividade de PON1 e CAT em cães com diferentes tipos de tumor de mama.....	28

ARTIGO 2

Figure 1. Cell culture results. A – Results of the cell toxicity assay; B – Results of the tumor inhibition assay. Bars represent the optical densities obtained at 540nm in the MTT experiment. The dotted line represent 90% of the results obtained for the control, past this line cell viability is considered. CC represents the control wells, untreated with copaiba oil. Error bars represent the standard deviation	41
Figure 2. Seric enzyme levels in rats from the <i>in vivo</i> toxicity experiment. A- PON 1 activity, no difference was observed. B- Alkaline Phosphatase, animals in T2 had statistically higher levels ($P<0.05$) than both other groups. C- Alanine Aminotransferase, no difference was observed. D- Aspartate Aminotransferase, no difference was observed.....	43
Figure 3. PON 1 activity in animals of the experimental mammary tumor experiment. A- Induced animals that developed (positive) and did not develop (negative) any tumor. No difference was observed. B- Copaíba oil treatment groups (T1- 0.3 g/Kg; T2- 0.6 g/Kg; T5- NaCl), no difference was observed.....	44

Lista de Tabelas

ARTIGO 1

Tabela 1: Distribuição dos tipos histopatológicos dos tumores de acordo com os grupos: tumores mamários múltiplos (TMM) e tumores mamários únicos (TMU).....	25
Tabela 2: Médias e desvio padrão da atividade de arilesterase (PON1) e capacidade antioxidante total (CAT) entre os grupos de diferentes tipos histológicos de câncer de mama em cães.....	26

ARTIGO 2

Table 1. Oil dilutions in the cell toxicity assay and the tumor inhibition assay.....	39
Table 2. Survival, biochemical parameters, and PON1 activity in animals participating in the <i>in vivo</i> toxicity experiment.....	42

Lista de Abreviaturas

ALT – Alanina Amino Transferase
ARE – Arilesterase
AST – Aspartato Amino Transferase
CAT – CapacidadeAntioxidante Total
FA – Fosfatase Alcalina
INCA – Instituto Nacional do Câncer
MEM – Meio essencial mínimo
PON – Paraoxanase
TMM – Tumores Mamários Múltiplos
TMU – Tumores Mamários Únicos

Sumário

1. Introdução.....	12
2. Objetivos.....	17
3. Artigos.....	18
Artigo 1 Avaliação da atividade de PON 1 e capacidade antioxidante total em cães com tumores mamários.....	19
Artigo 2 Assessing Copaíba oil (Copaifera sp.) as an anti-tumor agent.....	35
4. Conclusões.....	49
5. Referências.....	50

1 INTRODUÇÃO

A neoplasia mamária é a mais frequente em mulheres (INCA, 2012) e também em fêmeas caninas (CASSALI et al, 2009; FIGHERA et al, 2008). A similaridade nas formas de apresentação destes tumores entre as duas espécies fazem com que estudos realizados em cadelas possam ser extrapolados para as mulheres (PINHO et al, 2012). Atualmente, o uso de modelos biológicos com deleções gênicas, xenoenxertos e induzidos quimicamente para o desenvolvimento do tumor mamário tem sido uma ferramenta muito utilizada para o melhor entendimento e na busca por melhor qualidade de vida de pacientes neoplásicos (PINHO et al, 2012; GORDON e KHANNA, 2010). O comportamento biológico da neoplasia mamária em modelos animais tem ampliado a possibilidade de estudos mais específicos da doença por permitirem um maior acesso a dados bioquímicos e moleculares nesses animais. Neste modelo, é possível trabalhar a biologia tumoral de forma mais complexa e similar ao que ocorre em outras espécies (HENNIGHAUSEN, 2000; PINHO et al, 2012). As neoplasias mamárias na cadela apresentam-se, geralmente, como nodulações circunscritas, com dimensões, consistência e mobilidade à pele e musculatura variáveis, podendo estar associados à ulceração cutânea e reações inflamatórias locais. Frequentemente são observados múltiplos tumores em uma mesma mama ou envolvendo simultaneamente várias mamas (tumores multicêntricos), os quais podem apresentar diferentes tipos histológicos contudo, sempre o tumor de pior prognóstico determinará a evolução clínica do paciente (CASSALI et al, 2009).

O surgimento das neoplasias mamárias bem como o estabelecimento das metástases está relacionado com uma série de fatores, dentre eles a liberação de radicais livres (PANIS et al, 2011). Os radicais livres são produtos intermediários do metabolismo celular oxidativo, os quais atuam como sinalizadores moleculares vasculares (HALLIWELL, 2006). A efetividade das drogas antineoplásicas é questionada visto que, por serem citotóxicas, acabam estimulando uma liberação excessiva de radicais livres (CONKLIN, 2004; OZBEN, 2006), o que poderia estar

estimulando a formação metastática em decorrência das lesões causadas nas células tumorais (ISHII et al, 1996; GROSSELIN et al, 2009). Em pacientes com tumores de mama, se observam altos níveis de estresse oxidativo, com formação de adutos de DNA para formar tecido tumoral mamário (NOWSHHEEN et al, 2009) e com elevação significativa dos níveis de marcadores de estresse oxidativo no plasma destes pacientes (SENER et al, 2007), podendo também ocorrer alterações na dinâmica sanguínea (OZBEN, 2006).

Além de ter papel importante na homeostase celular, os radicais livres são conhecidos por induzir o dano celular grave e promover o desenvolvimento de certas patologias. Em geral, todas as biomoléculas são alvo de radicais livres, assim, lipídios, proteínas, hidratos de carbono e material genético estão sujeitos a serem atacados. A peroxidação lipídica é um processo autocatalítico, em que os hidroperóxidos e epóxidos secundários e aldeídos são formados (VERA-RAMIREZ et al, 2011).

Cães não castrados e/ou que recebem doses de progestágenos durante a vida, são predispostos ao surgimento de tumores de mama durante a vida adulta ou na velhice. Tem-se verificado crescente evidência da etiologia hormonal para o tumor de mama em cadelas, sendo que o índice de risco varia entre cadelas castradas e não castradas e depende ainda da fase em que a intervenção cirúrgica é efetuada. A ovariectomia (OV) realizada antes do primeiro estro reduz o risco de desenvolvimento da neoplasia mamária para 0,5%; este risco aumenta significativamente nas fêmeas esterilizadas após o primeiro ciclo estral (8,0%) e o segundo (26%). A proteção conferida pela castração desaparece após os dois anos e meio de idade, quando nenhum efeito é obtido (DALECK, FONSECA, 2000). Sabe-se que os estrogênios endógenos e sintéticos são convertidos, através de hidroxilação aromática por citocromo P-450 e enzimas específicas microsomais, em catecol estrógeno, como por exemplo o estradiol de 4-hidroxi (4-OH-E2), e em estrogênio semi-quinonas e quinonas. A formação de estrógenos catecol e suas quinonas é acompanhada de produção de espécie reativas ao oxigênio, que geram danos celulares (VERA-RAMIREZ et al, 2011).

Ensaios *in vitro* com células humanas mostram uma associação significativa entre a formação tumoral e estresse oxidativo relacionados com o envelhecimento. Esta relação fornece uma explicação molecular da maior incidência de doenças neoplásicas em idosos e mostra que os mecanismos moleculares que permitem

surgimento do tumor são movidos por espécies reativas ao oxigênio acumulados durante o envelhecimento (GROSSELIN et al, 2009).

O processo de peroxidação lipídica causa danos oxidativos membranas celulares, lipoproteínas e demais estruturas que contém lipídios. O excesso de subprodutos da peroxidação lipídica está diretamente relacionado com a patogênese de vários tipos de câncer (KLAUNIG, KAMENDULIS, 2004). Todas estas modificações oxidativas causam mudanças nas propriedades físicas e químicas das membranas, alterando sua fluidez e permeabilidade, com expansão do líquido intracelular e risco de ruptura das membranas da célula e das organelas, com conseqüente morte celular. Reações envolvendo os vários intermediários entre si levam a novos produtos, por exemplo, malondialdeído (MDA) que é detectado em testes de avaliação do balanço oxidativo (VASCONCELOS et al, 2007).

A desintoxicação dos radicais livres é realizada por moléculas pequenas, tais como as vitaminas C e E, e pelas enzimas que clivam as moléculas reativas ao oxigênio para gerar subprodutos não tóxicos às células (FANG et al, 2013). Um papel importante na defesa contra os efeitos tóxicos do aumento dos radicais livres sistêmicos é desenvolvido pela paraoxonase 1 (PON1), uma enzima antioxidante, que atua associada com a lipoproteína de alta densidade (HDL). A PON1 tem várias funções, entre elas impedir a modificação oxidativa da lipoproteína de baixa densidade (LDL) e eliminando radicais lipossolúveis cancerosos. A atividade de PON1 varia muito entre os indivíduos, que é, em parte, relacionada com polimorfismos no gene da PON1 gene. Atividades reduzidas de PON1 foram relacionados com a patogênese de várias doenças, incluindo cardiovasculares, neurodegenerativas, autoimunes e vários tipos de câncer (FANG et al, 2013; SAADAT, 2012).

A paraoxanase é produzida pelo fígado e que é capaz de remover os produtos da peroxidação lipídica (FANG et al, 2013), e possui papel importante no estresse oxidativo. O polimorfismo do gene que a codifica altera a sua atividade, podendo esta estar reduzida, o que prejudica a sua atuação na remoção destes produtos e conseqüentemente permitindo o surgimento de danos ao organismo e doenças relacionadas a isto como o câncer (SAADAT, 2012).

A capacidade antioxidante total (CAT) de uma amostra biológica (sangue, plasma) é capaz de fornecer informações sobre o balanço oxidativo. No que se refere aos antioxidantes, alguns autores defendem o estudo da capacidade

antioxidante total (CAT), ao invés de análise de antioxidantes isolados, principalmente devido à interação que existe entre eles no plasma ou soro. Na análise da CAT, leva-se em conta a ação acumulativa de todos os antioxidantes presentes; obtém-se um parâmetro integrado, capaz de revelar nuances acerca do delicado equilíbrio redox existente *in vivo*. A medida de CAT auxilia na avaliação dos fatores nutricionais, fisiológicos e ambientais do balanço redox em seres humanos. (VASCONCELOS et al, 2007). Se a CAT estiver alta, significa que o paciente tem baixos níveis de radicais livres circulantes, se estiver baixa, este indivíduo está com a capacidade de neutralização desses radicais diminuída, permitindo que eles atuem, causando danos ao organismo (FERRARI, 2010). Isso coloca os níveis de CAT diretamente ligados ao fenômeno do surgimento de tumores, que sofre uma grande influência da presença de radicais livres (VERA-RAMIREZ, et al, 2011).

Com o intuito de reduzir estes danos, o uso de antioxidantes como adjuvantes no tratamento antineoplásico tem evoluído, assim como as pesquisas em torno de novos compostos que possam atuar minimizando a malignidade e favorecendo o prognóstico de pacientes com câncer (VERA-RAMIREZ et al, 2011). Plantas com componentes bioativos têm sido usadas desde tempos pré-históricos. Estes compostos estão sendo isolados e suas atribuições farmacológicas confirmadas ou negadas (WANG et al. , 2011). São árvores nativas da região tropical da América Latina e África Ocidental, popularmente conhecidas como copaibeira ou pau d'óleo resina. No Brasil, são encontradas facilmente nas regiões Amazônica e Centro-oeste. O gênero *Copaifera* L. pertence à família Fabaceae Lindl., sub família *Caesalpinioideae* Kunth (VEIGA JÚNIOR; PINTO, 2002). O óleo de copaíba, obtido através de uma perfuração no tronco de uma árvore da espécie *Copaifera*, é utilizado com vários fins, sendo administrado tanto por via tópica como por via oral, em dosagens diversas. O potencial antioxidante e anticarcinogênico da copaíba tem sido reportado em modelos *in vitro*, com estudos em cultivos de células MCF-7 que são originárias de tumor mamário humano. Contudo, estudos mais específicos ainda devem ser realizados (SANTOS JUNIOR et al, 2010). Os compostos fenólicos presentes no óleo resina de copaíba parecem apresentar capacidade de reduzir os danos causados pelo estresse oxidativo no organismo (SENEDESE et al, 2013)

Em um estudo utilizando o óleo resina de copaíba por via oral em camundongos (*Mus musculus*), Chen Chen e Sena (2002) observaram sinais de toxicidade nos eritrócitos dos animais, sendo a toxicidade aumentada de acordo com a dose

administrada. Como tratamento tópico, o óleo resina não apresentou sinais de toxicidade em ratos Wistar (MAISTRO et al, 2005). Já quando realizado um teste de toxicidade aguda, onde o óleo resina de copaíba foi administrado por via oral em ratas prenhes, mostrou toxicidade na mãe e nos embriões (SACHETI et al, 2009).

As condições atuais de vida tanto animal como humana predispõem ao desenvolvimento de tumorações. Os indivíduos acometidos pelo câncer e submetidos a terapias antineoplásicas ainda sofrem danos no organismo, portanto o desenvolvimento de substâncias que minimizem esta situação torna-se de extrema importância para a qualidade de vida destes pacientes. O óleo de copaíba tem sido utilizado popularmente para várias afecções, porém ainda faltam esclarecimentos sobre a sua atuação em relação a neoplasmas mamários. Diante disto, a realização deste estudo pioneiro e a publicação dos resultados na comunidade acadêmica resultará em novas possibilidades terapêuticas como adjuvante no tratamento de enfermidades como o câncer.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi avaliar parâmetros associados ao estresse oxidativo de cães com diferentes tipos de tumores mamários. Avaliou-se também o uso do óleo resina de copaíba como possível adjuvante na terapia antitumoral.

2.1.1 Objetivos específicos

- Determinar a atividade da enzima PON1 e a capacidade antioxidante total em cães portadores de tumores mamários;
- Correlacionar a atividade da enzima PON1 com a capacidade antioxidante total em cães portadores de tumores mamários;
- Determinar possíveis relações do tipo tumoral com a capacidade antioxidante e atividade da enzima PON1;
- Avaliar a citotoxicidade do óleo resina de copaíba e determinar sua dose segura em cultivo celular;
- Determinar a dose tóxica e avaliar a toxicidade hepática em ratos Wistar tratados com óleo resina de copaíba;
- Avaliar a ação do óleo resina de copaíba em modelos biológicos com e sem tumor induzidos quimicamente;
- Determinar a atividade de PON 1 em modelos biológicos com e sem tumor induzidos quimicamente, tratados com óleo resina de copaíba.

3.1 Artigo 1

Avaliação da atividade de PON 1 e capacidade antioxidante total em cães com tumores mamários

Anelize de Oliveira Campello Felix; Andréia Nobre Anciuti; Thomas Normanton Guimm,
Samuel Rodrigues Felix; Márcia de Oliveira Nobre

Artigo a ser submetido à revista Ciência Rural

Avaliação da atividade de PON 1 e capacidade antioxidante total em cães com tumores mamários

Evaluation of PON 1 activity and total antioxidant capacity in dogs with mammary tumors

Anelize de Oliveira Campello Felix; Andréia Nobre Anciuti; Thomas Normanton Guimm, Samuel Rodrigues Felix; Márcia de Oliveira Nobre

Faculdade de Veterinária

Universidade Federal de Pelotas

anelizecampellofelix@gmail.com

Resumo

O surgimento de neoplasia de mama tanto em humanos como em cães se deve a vários fatores, sendo um deles, o estresse oxidativo. Os radicais resultantes de dano oxidativo são capazes de determinar o aparecimento desta enfermidade. A atividade da enzima paraoxanase (PON1) e a capacidade antioxidante total (CAT) refletem o status oxidativo dos indivíduos, surgindo como boas opções para o acompanhamento e estabelecimento de terapias em pacientes com tumores mamários. O objetivo deste estudo é demonstrar a atividade de PON1 e CAT em animais com neoplasia mamária. Foram analisados 25 cães com tumores mamários múltiplos e 25 com tumores mamários únicos. Eles foram divididos conforme o tipo histopatológico e dentre estes foram selecionados os tipos mais frequentes. Nestes, foram avaliadas a atividade da PON1 e a CAT. Ambas se apresentaram reduzidas em pacientes com tumores de mama, quando comparados com animais hígidos ($p < 0,05$). Porém não foi observada diferença significativa entre os grupos estudados. Com estes dados, conclui-se que o estresse oxidativo está diretamente ligado com o surgimento de tumores de

mama em cães, sendo uma opção de acompanhamento de evolução e diagnóstico precoce destes pacientes.

Palavras chave: neoplasia mamária, cães, PON1, CAT.

Abstract

Various factors will influence the occurrence of cancer, both in humans and dogs, with oxidative stress playing an important role. Free radicals from oxidative damage have a direct link to the disease. PON1 activity and the total antioxidant capacity (TAC) reflect the oxidative status of individuals, and could be options in monitoring and establishing therapies in mammary tumor patients. The purpose of this study was to describe PON1 activity and TAC in dogs with mammary tumors. 25 dogs with multiple mammary tumors and 25 dogs with one mammary tumor were assessed. They were divided according to the histopathological classification of the tumors, and the most frequent cases were chosen for further analysis. In these, PON1 activity and TAC levels were assessed. These parameters were both lower in those patients suffering from mammary tumors, when compared to healthy peers. However, no difference was observed when tumor types were compared ($p < 0.05$). These results show that oxidative stress is directly associated with mammary tumors in dogs, and these parameters can be used to monitor ongoing treatment.

Keywords: breast cancer, dogs, PON1, TAC.

INTRODUÇÃO

Entre todas as localizações de neoplasmas, a neoplasia mamária é a mais frequente em mulheres (INCA, 2012) e também em fêmeas caninas (CASSALI et al, 2009; FIGHERA et al, 2008). A similaridade nas formas de apresentação destes tumores entre as duas espécies

fazem com que estudos realizados em cadelas que desenvolvem naturalmente a doença possam ser extrapolados para as mulheres (PINHO et al, 2012).

O surgimento dos tumores mamários bem como o estabelecimento das metástases está relacionado com uma série de fatores, dentre eles a liberação de radicais livres (PANIS et al, 2011). Os radicais livres são produtos intermediários do metabolismo celular oxidativo, os quais atuam como sinalizadores moleculares vasculares (HALLIWELL, 2006). A efetividade das drogas antineoplásicas é questionada visto que, por serem citotóxicas, acabam ocasionando uma liberação excessiva de radicais livres (CONKLIN, 2004; OZBEN, 2006), o que poderia estar estimulando a formação metastática em decorrência das lesões causadas nas células tumorais (ISHII et al, 1996; GROSSELIN et al, 2009). Em pacientes com tumores de mama, se observam altos níveis de estresse oxidativo, com formação de adutos de DNA no tecido tumoral mamário (NOWSHHEEN et al, 2009) e com elevação significativa dos níveis de marcadores de estresse oxidativo no plasma destes pacientes (SENER et al, 2007), podendo também ocorrer alterações na dinâmica sanguínea (OZBEN, 2006).

A peroxidação lipídica é um exemplo de dano oxidativo observado em membranas celulares, lipoproteínas e demais estruturas que contém lipídios. O estresse oxidativo e o excesso de subprodutos da peroxidação lipídica estão diretamente relacionado com a patogênese de vários tipos de câncer (KLAUNIG, KAMENDULIS, 2004). A PON1 é uma enzima produzida pelo fígado que é capaz de remover os produtos da peroxidação lipídica. Ela atua ligada ao HDL e age na eliminação das espécies reativas ao oxigênio, contribuindo para a eliminação de radicais lipossolúveis carcinogênicos resultantes de peroxidação lipídica. (FANG, 2013). Em humanos, já foi relatado que a atividade PON1 é menor nos pacientes com vários tipos de câncer (BOBIN-DOUBIGEON 2012), o que demonstra o seu papel no estresse oxidativo ligado ao surgimento do câncer.

Em cães, não há estudos relacionando o surgimento de câncer com a atividade de PON1. O objetivo deste trabalho é demonstrar a atividade de paraoxanase 1 (PON1) e capacidade antioxidante total (CAT) em animais com neoplasia de mama.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Foram utilizados para este estudo, 50 cães, fêmeas. Para inclusão no estudo, os animais deveriam apresentar como queixa principal nodulações em região mamária, compatíveis com neoplasmas e que fosse encaminhados para realização de procedimento cirúrgico para remoção dos nódulos. Estes foram analisados e receberam uma classificação histopatológica. Foram selecionados 25 animais com tumores mamários múltiplos (TMM) e 25 com tumores mamários únicos (TMU)., caracterizados histopatologicamente. Estes foram subdivididos em grupos conforme o tipo do neoplasma, caracterizado histopatologicamente (tabela 1). Foram incluídos ainda animais hígidos, os quais não apresentavam nodulações mamárias, nem histórico de mastectomia, como controle. Amostras sanguíneas foram obtidas imediatamente antes da realização da cirurgia, através de venopunção da veia cefálica. Eram coletados em média 3ml de sangue, os quais eram armazenado em tubos contendo gel ativador de coágulo. Após a formação do coágulo, os tubos eram centrifugados a 3 mil rotações por minuto durante 10 minutos, para obtenção do soro. Este era acondicionado em micotubos e mantido congelado a -80C até o momento das análises. O projeto foi submetido à análise pela CEEA e obteve parecer favorável à sua execução (8529).

Atividade de PON 1

Para análise da atividade PON 1, foram selecionados 18 animais que apresentaram tumores mamários múltiplos (TMM) e 12 com apenas um tipo de tumor de mama (TMU). Os animais foram selecionados de acordo com o tipo tumoral mais frequente, conforme indicado na Tabela 1. A atividade da PON 1 foi medida através da técnica do fenilacetato (Sigma – Aldrich). A atividade foi avaliada a partir da taxa de formação de fenol monitorada através da absorvância à 207 nm e 25 °C. O reagente de trabalho utilizado é composto por 100 ml de Tampão 20 mM Tris/HCl pH 8.0, contendo 1 mM CaCl₂ e 50 uL de fenilacetato como substrato. As amostras foram diluídas 1 para 3 em Tampão 20 mM Tris/HCl (10 uL de amostra e 20 uL de Tampão) e foi adicionado 3.3 ul desta diluição em 500 uL da solução de trabalho. A leitura foi realizada em espectrofotômetro utilizando cubeta de quartzo, na faixa de 270 nm, 20 seg de tempo de retenção, 1 min de tempo de leitura.

Capacidade antioxidante total (CAT)

A análise da capacidade antioxidante total foi realizada nos mesmo animais selecionados para análise da PON 1. A capacidade antioxidante total foi determinada com o uso do kit comercial “Cayman Antioxidant Assay Kit” (Cayman Chemical Company, 1180 E. Ellsworth Rd. Ann Arbor, MI 48108 - USA), de acordo com as recomendações do fabricante. Brevemente, a capacidade antioxidante total foi aferida através de reação colorimétrica, medida à 405 nm, que avaliou a capacidade dos antioxidantes de inibir a oxidação de ABTS (2,2'-Azino-di-[sulfato-3-ethylbeztiazolina]) pela metamioglobina. A capacidade antioxidante das amostras foi comparada com um padrão (Trolox) e o resultado expresso em equivalente trolox (mM).

Análise estatística

Todos os resultados foram analisados utilizando o software Graph Pad Prism 5. Foi utilizado o teste T de student para comparação entre médias nos ensaios de atividade da PON1 e CAT. Para avaliar a correlação entre os parâmetros, teste de Pearson foi realizado. Quando os valores de P de 0,05 ou menos foram expressos, diferença estatisticamente significativa foi considerada.

RESULTADOS

Dos 25 animais com TMM, os casos mais frequentes foram: carcinossarcoma (n=16), carcinoma tubular (n=13) e mioepitelioma maligno (n=9). Nos pacientes com TMU, os mais frequentes foram: carcinossarcoma (n=8) e carcinoma complexo (n=7) (tabela 1).

Tabela 1: Distribuição dos tipos histopatológicos dos tumores de acordo com os grupos: tumores mamários múltiplos (TMM) e tumores mamários únicos (TMU).

Grupo	Animal	Classificação histopatológica
TMM	1a	Carcinossarcoma; Carcinoma Complexo
	2b	Carcinoma tubular; Carcinoma de células fusiformes; Carcinoma tubulo-papilar
	3	Carcinoma tubular; Carcinoma complexo
	4a	Carcinossarcoma; Carcinoma complexo
	5	Carcinoma tubular; Carcinoma complexo; Carcinoma tubulo-papilar
	6a	Carcinossarcoma; Carcinoma tubulo-papilar
	7b	Carcinossarcoma; Carcinoma tubular
	8	Carcinossarcoma; Carcinoma rico em lipídeos
	9c	Carcinossarcoma; Carcinoma complexo; Carcinoma tubulo-papilar; Carcinoma sólido; Mioepitelioma maligno; Carcinoma tubular
	10	Carcinossarcoma; Mioepitelioma maligno
	11	Carcinossarcoma; Carcinoma sólido
	12	Carcinoma tubular; Carcinoma complexo; Mioepitelioma maligno
	13b	Carcinoma tubular; Carcinoma adenoescamoso
	14a	Carcinossarcoma; Mioepitelioma maligno; Carcinoma tubulo-papilar
	15c	Carcinoma; Mioepitelioma maligno
	16c	Carcinoma; Mioepitelioma maligno
	17c	Carcinoma; Mioepitelioma maligno; Carcinoma papilar
	18c	Carcinoma tubular; Mioepitelioma maligno; Carcinoma
	19	Carcinoma complexo; Carcinoma papilar
	20	Carcinossarcoma; Carcinoma tubular
	21c	Carcinoma tubular; Carcinossarcoma; Mioepitelioma maligno; Carcinoma papilar
	22b	Carcinossarcoma; Mioepitelioma maligno; Carcinoma tubular; Carcinoma sólido
	23a	Carcinossarcoma; Carcinoma tubulo-papilar
	24c	Carcinoma; Mioepitelioma maligno
	25b	Carcinoma tubular; Carcinoma papilar
TMU	26	Carcinoma sólido
	27	Carcinoma tubular
	28	Carcinoma sólido
	29	Carcinoma anaplásico
	30	Carcinoma anaplásico
	31	Carcinossarcoma
	32d	Carcinossarcoma
	33d	Carcinossarcoma
	34d	Carcinossarcoma
	35d	Carcinossarcoma
	36d	Carcinossarcoma
	37d	Carcinossarcoma
	38	Carcinossarcoma
	39	Carcinoma complexo
	40e	Carcinoma complexo
	41e	Carcinoma complexo
	42e	Carcinoma complexo
	43e	Carcinoma complexo
	44e	Carcinoma complexo
	45e	Carcinoma complexo
	46	Carcinoma tubulo-papilar
	47	Carcinoma tubulo-papilar
	48	Mioepitelioma maligno
	49	Mioepitelioma maligno
	50	Mioepitelioma maligno

a - Animais com tumor mamário múltiplo incluindo carcinossarcoma (TMMC)

b - Animais com tumor mamário múltiplo incluindo carcinoma tubular (TMMCT)

c - Animais com tumor mamário múltiplo incluindo mioepitelioma maligno (TMMM)

d - Animais com tumor mamário simples do tipo carcinossarcoma (TMUC)

e - animais com tumor mamário simples do tipo carcinoma complexo (TMUCC)

A média da atividade de PON 1 foi menor nos animais com TMM (59,47) do que nos animais com TMU (66,26), como mostra a figura 1. Ambos os grupos diferiram

significativamente ($p < 0,001$) do grupo controle (120,08) . Dentro do grupo TMM, observou-se que os diferentes tipos tumorais diferiram significativamente ($p = 0,001$) entre si e do controle (figura 2). Em relação à CAT, foi observada diferença significativa entre os grupos e com o controle (tabela 2). Entre os tipos histológicos, houve diferença significativa da CAT entre os grupos e destes com o controle, que estão expressos na tabela 2 e na figura 3. Houve uma correlação positiva significativa ($p = 0,0017$) de modera intensidade ($r^2 = 0,4854$) entre os níveis de CAT e a atividade de PON 1 (figura 4).

Tabela 2: Médias e desvio padrão da atividade de arilesterase (PON1) e capacidade antioxidante total (CAT) entre os grupos de diferentes tipos histológicos de câncer de mama em cães

Grupo	PON1 média (DP)	CAT media (DP)
TMMC	74.9 (± 12.2) ^a	0.58 (± 0.63) ^a
TMMCT	57.6 (± 13.7) ^b	0.00021 (± 0.0) ^a
TMMM	45.9 (± 11.7) ^b	0.08 (± 0.08) ^a
TMUC	66.7 (± 16.2) ^{ab}	0.22 (± 0.36) ^a
TMUCC	64.1 (± 28.7) ^{ab}	0.61 (± 0.93) ^{ab}
Controle	120.1 (± 12.5) ^c	2.4 (± 1.65) ^b

TMMC- Animais com tumor mamário múltiplo incluindo carcinossarcoma; TMMCT- Animais com tumor mamário múltiplo incluindo carcinoma tubular; TMMM- Animais com tumor mamário múltiplo incluindo mioepitelioma maligno; TMUC- Animais com tumor mamário simples do tipo carcinossarcoma; TMUCC- animais com tumor mamário simples do tipo carcinoma complexo (TMUCC). Valores de média \pm desvio padrão. Letras diferentes representam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).

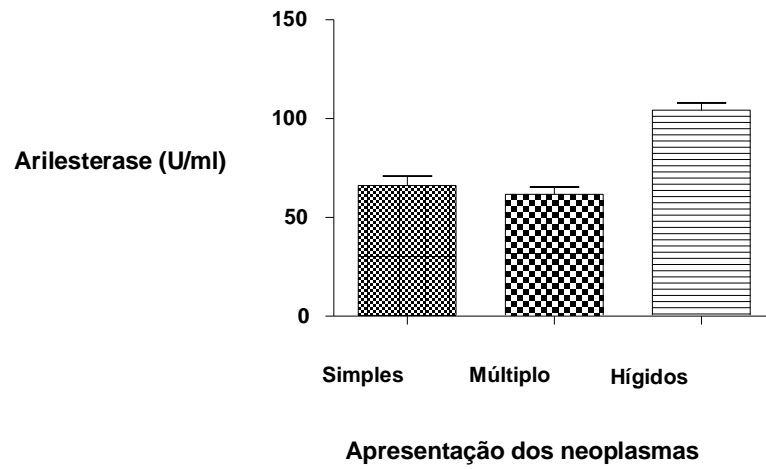


Figura 1: Atividade da PON 1 em cães com Tumores Mamários Múltiplos, Tumores Mamários Simples e animais hígidos ($p < 0,001$).

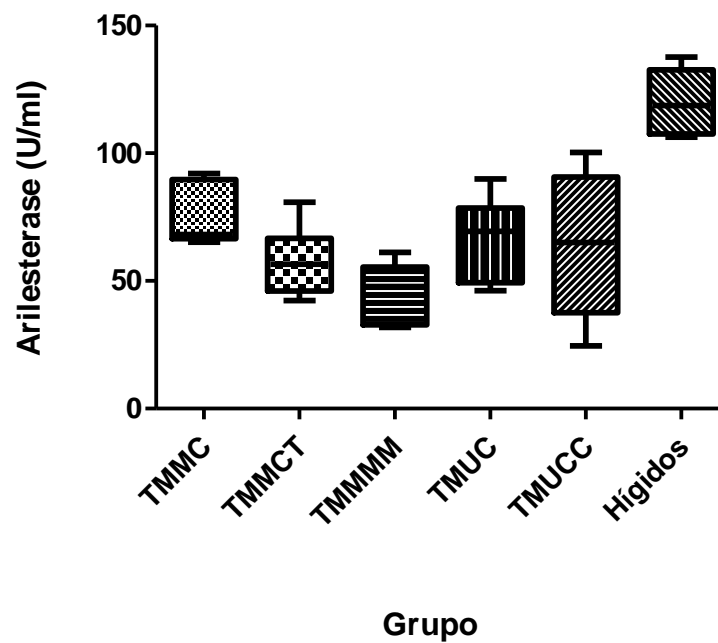


Figura 2: Atividade de PON 1 em cães com diferentes tipos de tumor de mama.

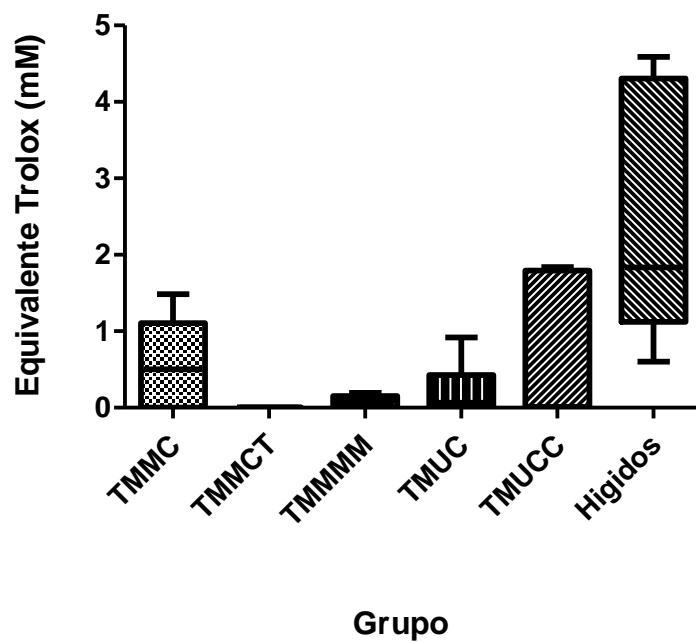


Figura 3: Capacidade antioxidante total (CAT) em cães com diferentes tipos de tumor de mama.

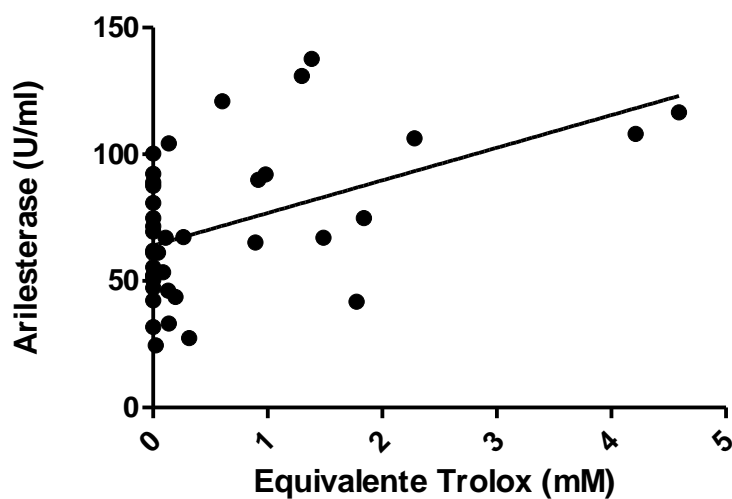


Figura 4: Correlação entre atividade de PON1 e CAT em cães com diferentes tipos de tumor de mama.

DISCUSSÃO

A redução na atividade da PON 1 vem sendo relatada em pacientes humanos que desenvolvem diversos tipos de câncer (KARAMAN et al, 2010). Essa redução estaria diretamente relacionada com o surgimento dos tumores, devido ao aumento dos níveis de radicais livres no organismo destes pacientes (BALCI et al, 2012). Em cães, pouco se sabe a respeito da atividade da PON 1 em pacientes com câncer, de qualquer tipo. Existem alguns trabalhos que relatam a atividade desta enzima em animais com leishmaniose, que sofrem tratamento para a doença (ROSSI et al, 2013; MARTINEZ-SUBIELA et al, 2014). Além dos relatos da sua relação com o surgimento de neoplasmas, já foi observado uma relação com o tempo de sobrevivência de pacientes humanos com câncer de mama e níveis reduzidos da atividade da PON 1 (BOBIN-DUBIGEON et al, 2012). Mais recentemente, foi observado que o alelo PON1-55M do gene da PON 1 estaria relacionado ao risco de desenvolvimento de neoplasia (FANG et al, 2012). A atividade da PON 1 também tem sido estudada como um biomarcador do estadiamento do câncer, surgindo como uma alternativa de monitoramento dos pacientes (MAFFEI et al, 2011).

A capacidade antioxidante total ou CAT representa os níveis de antioxidantes presentes no organismo capazes de inibir a formação e liberação de radicais livres. Quanto maior a CAT, menor a possibilidade das moléculas resultantes da peroxidação lipídica causarem danos ao organismo, reduzindo as chances do surgimento de tumores (VERA-RAMIREZ et al, 2011). Além disso, em pacientes que já desenvolveram o câncer, tem uma maior probabilidade de desenvolvimento de metástases, visto que o estresse oxidativo é um dos responsáveis pelo estabelecimento de novos focos da doença (PANIS et al, 2011). Pacientes humanos que sofrem a remoção cirúrgica do tumor e são submetidos à quimioterapia também tem a sua CAT alterada, pois a medicação induz a liberação de radicais livres (CONKLIN, 2004). Nos cães, o foco é a prevenção do estresse oxidativo, considerando

que o tratamento quimioterápico ainda não se mostra eficaz em alguns casos de câncer de mama (SORENMO, 2003).

Contudo, obtivemos uma correlação positiva significativa ($p=0,0017$) de moderada intensidade ($r^2= 0.4854$) entre os níveis de CAT e a atividade de PON 1. Isso indica, que quanto maior a atividade da PON 1, maior a capacidade antioxidante do indivíduo. Isso é esperado, pois a PON 1 atua inibindo os radicais livres resultantes do estresse oxidativo, resultando numa maior capacidade do indivíduo de coibir a atuação destes radicais no seu organismo (VERA-RAMIREZ et al, 2011). Em estudos com pacientes humanos com câncer, esta relação entre a atividade de PON 1 e marcadores de estresse oxidativo já foi observada (KARAMAN et al, 2010).

Em relação aos tipos tumorais, ainda não é possível correlacionar os níveis de CAT e PON1 com o tipo tumoral, nem mesmo em humanos. Estudos acerca da atividade da paraoxanase em pacientes com diversos tipos de câncer, não conseguiram estabelecer relação desta com o tipo tumoral nem com o surgimento de metástases, mas são capazes de afirmar que polimorfismos no genoma da PON1 estão diretamente relacionadas ao surgimento dos tumores (BALCI et al, 2012; SAADAT, 2011). O estresse oxidativo está diretamente relacionado com o surgimento de câncer, mas não é desta forma que o tipo tumoral é determinado. A tendência ao desenvolvimento de tumor é uma particularidade de cada indivíduo, que acaba recebendo um incremento com o excesso de radicais livres presentes no organismo. Assim como a PON1, a CAT não é capaz de determinar o tipo histopatológico do tumor, agindo apenas como um fator agravante para o surgimento tumoral.

Esses fatores atentam para a necessidade da busca por fatores preventivos da ocorrência desta doença em cães, considerando que o tratamento com quimioterápicos é bastante difícil na espécie. Medicamentos e compostos que atuem minimizando os danos oxidativos podem atuar como bons adjuvantes na prevenção do aparecimento do câncer. Além

disso, podem auxiliar na redução de casos de reicidiva de tumores, fato este tão frequente em cães com tumores mama.

CONCLUSÃO

A atividade da PON1 e a capacidade antioxidante total estão significativamente reduzidas em cães com tumores de mama, sejam eles únicos ou múltiplos. Este resultado, indica um novo ponto de atuação na prevenção desta enfermidade, comprovando que o estresse oxidativo está diretamente ligado ao surgimento dos tumores de mama.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Hospital de Clínicas Veterinária e ao Laboratório de Patologia Animal da Universidade Federal de Pelotas, pelo fornecimento das amostras e análises anátomo-patológicas. Agradecemos à CAPES pelo auxílio financeiro.

REFERÊNCIAS

- BALCI, H.; GENÇ, H.; PAPILA, C.; CAN, G.; PAPILA, B.; YANARDAG, H.; UZUN, H. Serum Lipid Hydroperoxide Levels and Paraoxonase Activity in Patients With Lung, Breast, and Colorectal Cancer. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**. n. 26, p. 155–160, 2012.
- BOBIN-DUBIGEON, C.; JAFFRÉ, I.; JOALLAND, M.P.; CLASSE, J.M.; CAMPONE, M.; HERVÉ, M.; BAR, J. M. Paraoxonase 1 (PON1) as a marker of short term death in breast cancer recurrence. **Clinical Biochemistry**. n. 45, p. 1503–1505, 2012.
- CASSALI G.D., BERTAGNOLLI A.C., LAVALLE G.E., TAVARES W.L.F., FERREIRA E., SILVA A.E., CAMPOS C.B. Perspectives for diagnosis, prognosis and treatment of mammary 1181 neoplasms in dogs. **Proceedings of the 34th World Small Animal Veterinary Congress - WSAVA 2009**, 2009.

- CONKLIN, K.A. Chemotherapy-associated oxidative stress: impact on chemotherapeutic effectiveness. **Integrative Cancer Therapies**. n.3, p.294–300, 2004
- DRAGANOV, D.I.; TEIBER, J.F.; SPEELMAN, A.; OSAWA Y.; SUNAHARA R.; LA DU, B.N. Human paraoxonases (PON1,PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate speci-ficities. **Journal of Lipid Research** n. 46, p. 1239–1247, 2005.
- FANG, DAI-HUA; FAN, CONG-HAI; JI, QIANG; QI, BO-XIANG; LI, JUAN; WANG, LU. Differential effects of paraoxonase 1 (PON1) polymorphisms on cancer risk: evidence from 25 published studies. **Molecular Biology Reproduction** n. 39, p. 6801–6809, 2012.
- FIGHERA R.A., SOUZA T.M., SILVA M.C., BRUM J.S., GRAÇA D.L., KOMMERS G.D., IRIGOYEN L.F.; BARROS C.S.L.. Causas de morte e razões para eutanásia de cães da Mesorregião do Centro Ocidental Rio Grandense (1965-2004). **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 28, n. 4, p. 223-230. 2008
- GROSSELIN K, MARTIEN S, POURTIER A, et al. Senescence-associated oxidative DNA damage promotes the generation of neoplastic cells. **Cancer Research**. n. 69, p. 7917–25, 2009.
- HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiology** n.141, p. 312–22, 2006
- INCA INSTITUTO NACIONAL DO CANCER. <http://www2.inca.gov.br> acesso em: 17 de abril de 2012.
- ISHII K, ZHEN LX, WANG DH, FUNAMORI Y, OGAWA K, TAKETA K. Prevention of mammary tumorigenesis in acatalasemic mice by vitamin E supplementation. **Japanese Journal of Cancer Research**. n.87, p.680–4, 1996.
- KARAMAN, E.; UZUN, H.; PAPILA, I.; BALCI, H; ALPER, O.; GENÇ, H.; YANARDAG, H.; PAPILA, C. SERUM PARAOXONASE ACTIVITY AND OXIDATIVE DNA

DAMAGEIN Patients With Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. **The Journal of Craniofacial Surgery**. n. 6, 2010.

KLAUNIG J. E.; KAMENDULIS, L. M. The role of oxidative stress in carcinogenesis. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**. n. 44, p. 239–267, 2004.

MAFFEI, FRANCESCA; ANGELONI, CRISTINA; MALAGUTI, MARCO; MORAGA, JUAN MANUEL ZOLEZZI; PASQUI, FRANCESCA; POLI, CAROLINA; COLECCHIA, ANTONIO; FESTI, DAVIDE; HRELIA, PATRIZIA; HRELIA, SILVANA. Plasma antioxidant enzymes and clastogenic factors as possible biomarkers of colorectal cancer risk. **Mutation Research** n. 714, p. 88– 92, 2011.

MARTINEZ-SUBIELAA, S.; CERÓN, J.J.; STRAUSS-AYALIB, D.; GARCIA-MARTINEZA, J.D.; TECLESA, F.; TVARIJONAVICIUTEA, A.; CALDINC, M.; BANETHB, G. Serum ferritin and paraoxonase-1 in canine leishmaniosis. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**. n. 37, p. 23– 29, 2014.

NOWSHEEN, S.; WUKOVICH, R.L.; AZIZ, K. Accumulation of oxidatively induced clustered DNA lesions in human tumor tissues. **Mutation Research**. n. 674, p.131–62, 2009.

OZBEN, T. Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy. **Journal of Pharmaceutical Science**. n. 96, p. 2181–96, 2006.

PANIS, C.; VICTORINO, V. J.; HERRERA, A.C.S.A.; FREITAS, L.F.; DE ROSSI, T.; CAMPOS, F.C.; COLADO SIMÃO. A.N.; BARBOSA, D.S.; PINGE-FILHO, P.; CECCHINI, R.; CECCHINI, A.L. B. **Differential oxidative status and immune characterization of the early and advanced stages of human breast cancer**. 2011 DOI: 10.1007/s10549-011-1851-1

PINHO, S.S.; CARVALHO, S.; CABRAL, J.; REIS, C.A.; GARTNER, F. **Canine tumors: a spontaneous animal model of human carcinogenesis**. 2012 DOI: 10.1016/j.trsl.2011.11.005

ROSSI, G.; IBBA, F.; MEAZZI, S.; GIORDAN, A.; PALTRINIERI, S. Paraoxonase activity as a tool for clinical monitoring of dogs treated for canine leishmaniasis. *In press*.

SAADAT, M. Paraoxonase 1 genetic polymorphisms and susceptibility to breast cancer: A meta-analysis. **Cancer Epidemiology**. n. 36, p.101–103, 2012.

SENER, D.E.; GÖNENC, A.; AKINCI, M.; TORUN, M. Lipid peroxidation and total antioxidant status in patients with breast cancer. **Cell Biochemistry Function**. n. 25, p. 377–82, 2007.

SORENMO K. Canine mammary gland tumors. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**. n. 33, p. 573-596, 2003.

VERA-RAMIREZ, L.; ROVIRA, P.S.; RAMIREZ-TORTOSA, M.C.; RAMIREZ-TORTOSA, C.L.; GRANADOS-PRINCIPAL, S.; LORENTE, J.A.; QUILES, J.L. Free radicals in breast carcinogenesis, breast cancer progression and cancer stem cells. Biological bases to develop oxidative-based therapies. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**. 2011. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2011.01.004

3.2 Artigo 2

Assessing Copaíba oil (*Copaifera sp.*) as an anti-tumor agent

Anelize O. Campello Felix^{*1}, Mariana T. Tillmann¹, Andréia N. Anciuti¹, Fernanda Policarpo¹, Claudia B. M. Mendes¹, Thiago V. Lopes¹, Geferson Fischer¹, Samuel R. Felix¹, Márcia O. Nobre¹.

Artigo a ser submetido à revista *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative medicines*

Assessing Copaíba oil (*Copaifera sp.*) as an anti-tumor agent

Anelize O. Campello Felix*¹, Mariana T. Tillmann¹, Andréia N. Anciuti¹, Fernanda Policarpo¹, Claudia B. M. Mendes¹, Thiago V. Lopes¹, Geferson Fischer¹, Samuel R. Felix¹, Márcia O. Nobre¹.

¹ Universidade federal de Pelotas, Faculdade de Medicina Veterinária.

*Corresponding author: anelizecampellofelix@gmail.com

Abstract

Copaíba oil, obtained from trees of the *Copaifera* genus, has been used for centuries by the Mesoamerican people, treating all types of ailments. Recent research has shown the validity of several of these traditional applications. The purpose of this study was to assess the oils potential as an anti-tumor agent in a rat model for mammary tumors. To assess the oils cytotoxicity and inhibitory action on MCF7 mammary tumor cell lines, two *in vitro* experiments were conducted. To assess the safety of long term use of copaiba oil, as would be conducted in the tumor experiment, a repeated dose toxicity assay was conducted. In order to assess the *in vivo* effects of copaiba on mammary tumors, these were induced in Wistar rats with a single dose of DMBA, and copaiba treatment was conducted for six months. The oil was not toxic to VERO cell cultures when added in concentrations under 0.1% to the culture media. On the other hand, the oil inhibited the growth of MCF7 cells up to the greatest dilution assessed (10^{-6}), confirming its suggested anti-tumor properties. Long term, repeated dose toxicity of copaiba oil was observed in animals that received 1.2 and 2.4 g/Kg of the oil three times a week. Animals treated with 0.3 g/Kg did not show any adverse reaction, and those treated with 0.6 g/Kg had only slightly elevated Alkaline Phosphatase after 175 days of treatment. In the experimental mammary tumor assay, no difference was observed among treated and control groups, however, the low amount of tumors developed may have concealed the oils effect. In this study we show that copaiba oil has the potential to inhibit tumor growth, and can be used in long term, low dose, treatments.

Keywords: *Copaifera*, MCF7, DMBA, mammary tumor

Introduction

Plants with bioactive components have been used since pre-historic times. These compounds are now being isolated and their pharmacological attributions confirmed, or denied (WANG et al., 2011). On the other hand, the general notion that these phytotherapeutic products are “natural”, and therefore harmless, is a misconception that leads to a lack of toxicity studies (TUROLA & NASCIMENTO, 2006). These studies should be carried out before commercial, or widespread use of a determined phytotherapeutic preparation occurs, and are of utmost importance for the safety of treated patients (CUNHA et al., 2009).

The ample biodiversity of Brazil, particularly of the amazon region, means it is an abundant source for plants with pharmacological properties. As a result, international interest, both from an academic and an industrial point of view, regarding the pharmaceutical and economic potential of these plants, has risen in the last years. (COSTA-SILVA et al., 2006). Copaíba (*Copaifera spp.*) is a large tree, found mostly in northern Brazil, from which an oil-resin can be obtained by tapping the trunk (VEIGA JUNIOR et al., 2007). Studies regarding specific components found this resin to be complex, with numerous components, of which the suggested active molecules are hydrocarbon terpenes (SOUZA et al., 2011). Their suggested applications include antiinflammatory; antileishmanial drug; urolithiasis and various types of cancer (VEIGA JUNIOR et al, 2007; SANTOS et al, 2011; BRANCALION et al, 2012; SANTOS JÚNIOR, 2010).

Mammary tumors are the second most frequent cause of death in Brazil, and the most frequent among women, amounting to 22% of new cancer cases every year (INCA, 2012). Likewise, it is the most frequent tumor in dogs, representing up to 50% of all cases in this species (CASSALI et al., 2011). The occurrence of mammary tumors, as well as the establishment of metastatic lesions, is associated with a series of factors, foremost among which is the increase in free radicals (PANIS et al., 2011). In this light, the effectiveness of anti-neoplastic drugs can be questioned, since they are usually cytotoxic, and will induce an increase in free radical associated damage (CONKLIN, 2004; OZBEN, 2004), which could, in turn, induce metastatic formation as a result of the tumor cell damage (ISHII et al., 1996; GROSSELIN et al., 2009). In order to reduce these damages, the use of antioxidants as adjuvants in antineoplastic treatment has increased, as have the attempts to identify novel molecules that will act

in this manner, reducing the malignant effects, and favoring the prognosis for cancer patients (VERA-RAMIREZ et al., 2011). Natural plant extracts have been proposed as an option for cancer treatment (YOUNES et al., 2000), however, their action in vivo, and the associated risks are still poorly understood. Copaíba extracts have shown inhibitory action on cancerous cells in vitro (SANTOS JUNIOR et al., 2010), but their effect on tumors are yet to be described in vivo, and the oil itself has not been used in any such studies.

In this light, this study assesses the effect of copaiba oil in the rat model for mammary tumor. Furthermore, we assess possible toxic effects of the long term use of copaiba oil, as would be expected for cancer patients.

2. Material and Methods

2.1 Copaíba oil

The copaiba oil was obtained from a *Copaifera* tree from the state of Rondonia Brazil (10°.29'42"35N, 62°.40'48"60O), and a branch was taken to the botanic department of UFPel for identification (Registry n°: 6726 - Leguminosae-caes. *Copaifera*). The oil was obtained by drilling a hole directly onto the tree's trunk, and allowing the resin to flow into a container over a period of ~12 hours. The oil was maintained in refrigeration (4 °C) until use, and filtered through a paper filter prior to every experiment.

2.2 In vitro cell toxicity assay

Vero (green monkey kidney) cells were cultured in bottles and then 96 well plates, using bovine fetal serum (BFS) supplemented MEM as the nutrition media. Bottles and plates were kept in a 37 °C, 5% CO₂ environment. For the toxicity assay, the cells were cultured in 96 plate wells and, when confluence was obtained, the media was changed for MEM + copaíba oil at different concentrations (Table 1). In order to dilute the oil in MEM, a concentration of 1:128 of DMSO was added to the mix. This concentration was previously determined and had no significant effect on the cell culture alone (data not shown). The plates were then maintained at the culture conditions described, for 48 hours, and an MTT assay was conducted according to (Riss et al, 2004) . In each experiment, eight repetitions were made for every concentration, and the experiment was repeated three times.

2.3 In vitro MCF7 mammary tumor cell line inhibition assay

To assess the anti-cancer properties attributed to the copaiba oil, an experiment similar to the cell toxicity assay was conducted. Dilutions considered doubtfully cytotoxic in the previous experiment were not included, but further dilution was conducted (Table 1). In each experiment, eight repetitions were made for every concentration, and the experiment was repeated three times.

Table 1. Oil dilutions in the cell toxicity assay and the tumor inhibition assay

Oil proportion (%) in MEM	10	5	1	0.1	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	CC ^a
Cell Toxicity assay	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓
Tumor inhibition assay			✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

^a CC- untreated cell control

2.4 Animal models

Wistar rats were used in the animal experiments. All animals were kept in the animal facility of the Veterinary School (Universidade Federal de Pelotas – UFPel). Animals were kept under controlled conditions to guarantee comfortable living circumstances, and food and water were offered *ad libitum*. After the start of the experiments, animals were observed daily and euthanized when moribund. These experiments were approved by the ethics committee of UFPel, under the registry number: CEEA-8529.

2.5 In vivo toxicity experiment

22 Wistar Rats were submitted to a toxicity test to assess safe doses to be used *in vivo*. A first test involved 2 animals per group, doses that were not toxic in this first test were further examined. The animals were administered with either: 0.3 (n=6), 0.6 (n= 7), 1.2 (n=2), 2.4 (n=2) milligrams/Kg ou NaCl 0,9% (n= 5) of the copaiba oil, orally, three times a week for 175 days, according to the protocol that would later be used in the following experiments. Animals were observed daily for general alterations and deaths. Animals surviving to the end of the experiment were euthanized, and their blood collected for biochemical analysis.

2.6 Enzymes

Hepatic enzymes assessed were: alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and alkaline phosphatase (AP). Kinetic-colorimetric assays were used to determine enzyme levels in the sera, and the reactions were read in a spectrophotometer apparatus. The enzymes were assessed through the commercial kits ALT/GTP Liquiform®, AST/GOT Liquiform®, Fosfatase Alcalina Liquiform® da Labtest Diagnóstica S/A®, and all procedures were conducted according to the manufacturer's instructions.

2.7 Serum Paroxanase 1 (PON1)

PON1 activity was assessed through the fenilacetate assay. Arylesterase activity has been shown to accurately represent PON1 activity, with very low contribution of PON2 and PON3 (Draganov et al. 2005). Briefly, arylesterase activity was measured from the rate of formation of phenol by monitoring the increase in absorbance at 270 nm and 25°C. The working reagent used was composed of 100 ml 20 mM Tris/HCl buffer (pH 8.0), with 1 mm CaCl₂ and 50 uL de fenilacetate (Sigma) as the substrate. Samples were diluted 1:3 in a 20 mM Tris/HCl buffer (10 uL sample and 20 uL buffer) and 3.3 uL of this dilution was added to 500 uL of the working solution. The reaction was read through spectrophotometry at 270 nm, with a 20 second delay and one minute reading time. The activity was expressed in U/ml. Blank samples containing water were used to correct for non-enzymatic hydrolysis

2.8 Experimental mammary tumor assay

An experimental protocol to induce mammary tumors was used, according to Al-Dhaheeri (2008). Briefly, the rats (n= 30) were orally administered a single dose of 80 mg/kg DMBA (7,12-Dimethylbenz[a]anthracene® - Sigma), diluted in 1 mL of maize oil, and then treated three times a week with copaiba oil, administered orally, in two different doses: 0.3 mg/Kg (n= 9) and 0.6 mg/Kg (n=9), or mock treated with saline (n=12), for 175 days. The animals were assessed every other day, after treatment, in search of mammary tumors. At the end of the experiment the animals were euthanized, and the liver, kidneys, and lungs were harvested and kept in formaldehyde 10%. Any tumor mass, in the mammary glands, or otherwise, was also harvested and sent for histopathological examination. If tumors became too cumbersome, or were otherwise a threat to the animal's wellbeing, the animal was

euthanized before the end of the experiment, and the same procedures were conducted. PON1 activity was also assessed, as previously described.

2.9 Statistical analysis

All results were analyzed using the *Graph Pad Prism 5* software. A student's T test was used to compare mean results, in the cellular toxicity assays, PON1 assays and blood biochemistry. To assess the correlation among parameters, a Pearson's assay was conducted. When P values of 0.05 or less were expressed, statistically significant difference was considered.

3. Results

3.1 In vitro cell toxicity and tumor inhibition assays

The cellular toxicity assay results can be seen on Figure 1A. Briefly, copaiba oil concentrations of 0.1% and over were toxic to the proposed cell line, lower concentrations did not seem to effect Vero cells.

The tumor inhibition assay results can be seen on Figure 1B. Briefly, copaiba oil was able to inhibit the growth of MCF7 cells, effectively killing those that were present in the wells, up to the greatest dilution used (10^{-6} %). This indicates a clear effect specifically on tumor cells, since lower dilutions were not toxic in the prior experiment.

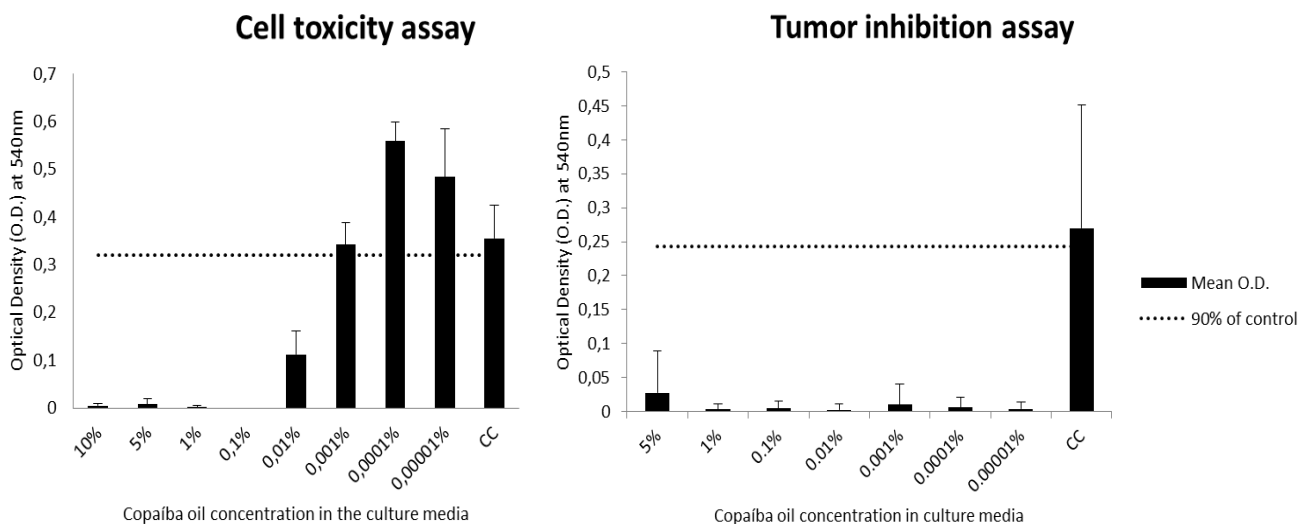


Figure 1. Cell culture results. A – Results of the cell toxicity assay; B – Results of the tumor inhibition assay. Bars represent the optical densities obtained at 540nm in the MTT experiment. The dotted line represent 90% of the results obtained for the control, past this line cell viability is considered. CC represents the control wells, untreated with copaiba oil. Error bars represent the standard deviation

3.2 *In vivo* toxicity experiment

The results for the *in vivo* toxicity experiment can be seen on Table 2. Briefly, copaiba oil doses over 0.6 mg/Kg were toxic, when administered orally to Wistar rats. Concentrations of 2.4 mg/Kg caused the death of both animals in up to 14 days. Groups that had full survival in the preliminary assay suffered a second assay for a total of six animals in T1 (0.3 g/Kg) and seven animals in T2 (0.6 g/Kg). Serum enzyme levels for animals in this experiment can be seen on table 2 and figure 2. Briefly, none of the assessed enzymes were altered by the long term use of copaiba oil at 0.3 g/Kg, on the contrary, PON1 activity seems to have slightly increased as an effect, but no statistically significant alteration was observed. Regarding the animals treated with 0.6 g/Kg, only AP was significantly altered, indicating some level of hepatic toxicity.

Table 2. Survival, biochemical parameters, and PON1 activity in animals participating in the *in vivo* toxicity experiment.

Copaiba oil doses	0.3 mg/Kg	0.6 mg/Kg	1.2 mg/Kg	2.4 mg/Kg	NaCl 0,9%
Days to death	N/A	4, 30	14	4, 14	N/A
Mean ALT (SD)	44.80 (19.70)	33.00 (10.58)	N/A	N/A	44.20 (15.53)
Mean AST(SD)	172.4 (109.8)	136.0 (29.55)	N/A	N/A	187.8 (122.0)
Mean AP(SD)	53.80 (13.39)	133.0 (24.33)	N/A	N/A	55.40 (16.86)
Mean PON1 Activity (SD)	174.5 (35.61)	100.9 (27.74)	N/A	N/A	144.3 (25.64)

N/A: not applied

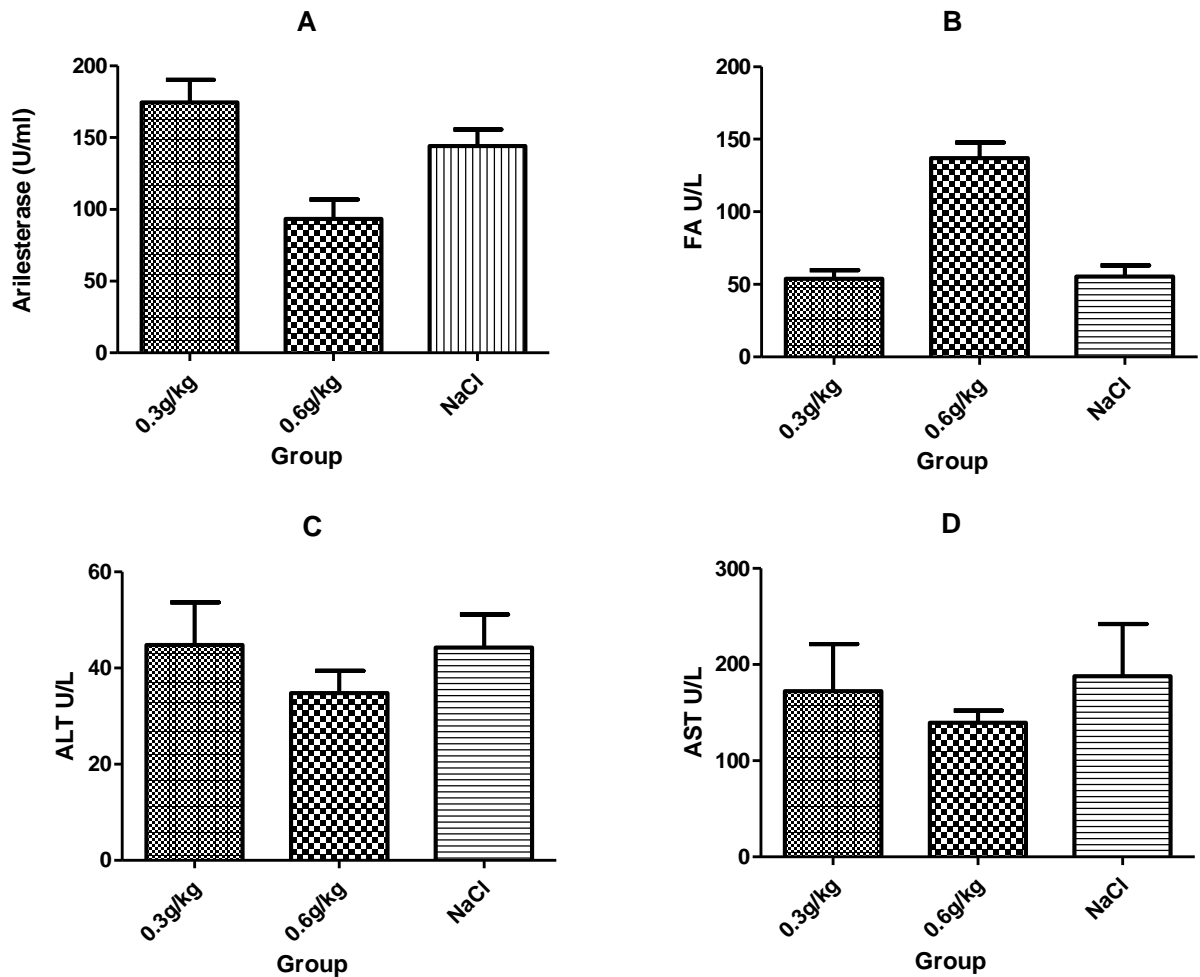


Figure 2. Seric enzyme levels in rats from the *in vivo* toxicity experiment. A- PON 1 activity, no difference was observed. B- Alkaline Phosphatase, animals in T2 (0.6g/kg) had statistically higher levels ($P < 0.05$) than both other groups. C- Alanine Aminotransferase, no difference was observed. D- Aaspartate Aminotransferase, no difference was observed.

3.3 Experimental mammary tumor assay

A manual search for tumors was conducted every two days, and masses could be detected in 10 animals up to the 25th week of observation. By 11 weeks the first tumor had been detected. Necropsy revealed that four of the tumors were in the mammary glands, and the other six in other regions. No difference was observed regarding the occurrence of tumors among groups, with three tumors in animals

treated with 0.3 g/Kg of copaiba oil and in the control, and four tumors in the group treated with 0.6 g/Kg of copaiba oil.

PON 1 was not significantly different among treated groups (Figure 3A). When tumor induced rats were compared regarding presence and absence of tumors. While PON 1 was slightly lower in the positive animals, as would be expected, no statistically significant difference was observed (Figure 3B).

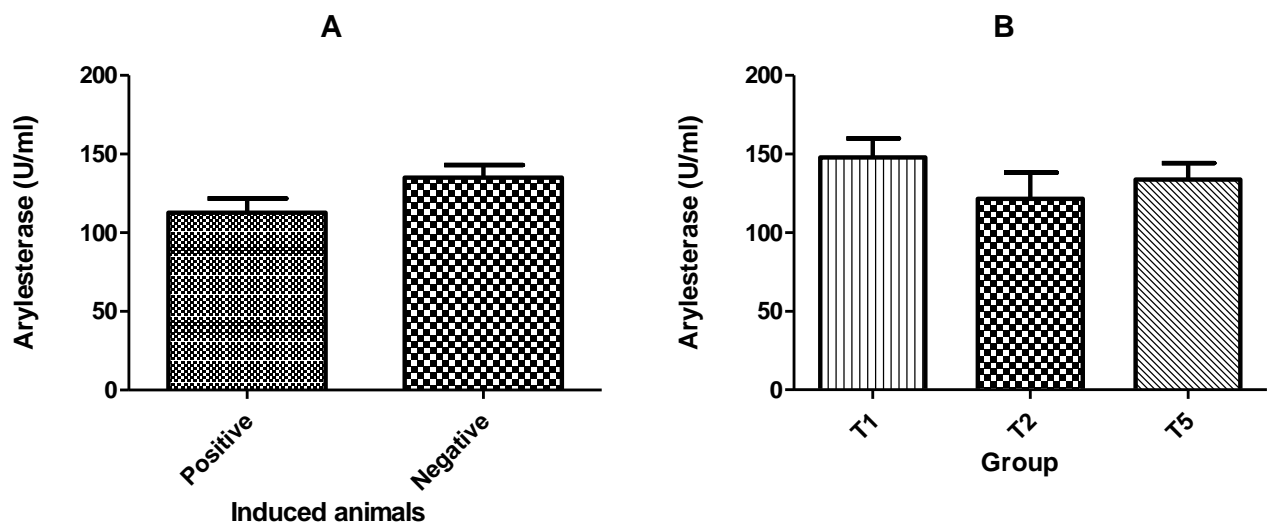


Figure 3. PON 1 activity in animals of the experimental mammary tumor experiment. A- Induced animals that developed (positive) and did not develop (negative) any tumor. No difference was observed. B- Copaiba oil treatment groups (T1- 0.3 g/Kg; T2- 0.6 g/Kg; T5- NaCl), no difference was observed

4. Discussion

Our study assessed safety regarding the use of copaiba oil, both *in vitro* and *in vivo*. While our results in the *in vitro* assay showed that a relatively low concentration of the oil in the culture media was toxic (Figure 1), this does not necessarily reflect what would be expected *in vivo*. The experiment conducted in Wistar rats showed that 0.3 g/Kg was safe for long term use. Other authors have described 0.5 g/Kg (Gomes et al., 2006) and 2 g/Kg (Sacheti et al., 2009) as safe doses, however, these studies used five day treatments only. Similar doses were toxic in our study, however, animals survived up to 14 days of treatment. It is noteworthy that, although 0.6 g/Kg

did induce death in some animals, the survivors seem to have adapted to the treatment, with little alteration in liver function after 175 days of treatment.

When the antitumor application of copaiba oil was assessed, we were able to demonstrate this effect *in vitro*. Other studies have demonstrated similar results, where growth inhibition of MCF-7 cells is obtained (Santos Junior et al., 2010), however our results reveal that very low doses of the oil, in the culture media, were able to inhibit growth, and effectively kill the tumor cells. The experiment in rats was jeopardized by a lack of induction of the mammary tumors by the chosen method. Rats that did develop tumors do not seem to have been affected by the treatment. Tumors, either mammary or otherwise, were induced in all treatment groups. Other authors have been able to indicate an anti-tumor effect in animal models, Lima and co-workers (2003) showed that the oil is effective in preventing melanoma in a mouse (C57BL/6) model for the disease. On the other hand, no definitive study has been able to demonstrate this effect for mammary tumors, and further investigation will be necessary.

In human cancer patients, PON1 activity has been shown to be lower than in healthy peers (Bobin-Dubigeon et al, 2012), since this is directly linked to an increase of free radicals due to oxidative stress, which, in turn, is associated with tumor formation (Vera-Ramirez et al, 2011). The use of antioxidant substances, able to act on PON1 will ultimately help modulate the oxidative stress response (Bub et al., 2005). The activity of this enzyme has also been used to assess the effectiveness of ongoing leishmaniasis treatment (Rossi et al., 2013). In our study, PON1 activity did not differ among the studied animals. In the toxicity experiment levels were not dose dependent and did not differ from the untreated controls. Likewise, in the induced mammary tumor assay, no difference among treatments was observed. Although no statistically relevant difference was observed when animals that did develop tumors were compared to those that were induced but did not develop tumors, the PON 1 activity did react as expected, and this may be observed in future experiments.

In this study we were able to demonstrate the suggested, but yet un-assessed, anti-mammary tumor activity of copaiba oil. A definitive *in vitro* result, where tumor inhibition continued well beyond cell toxicity, was generated. Furthermore, while we were not able to demonstrate *in vivo* anti-tumor activity, safe doses for long term use of copaiba oil, as would be expected in cancer treatment, could be determined. Further studies should be conducted to definitively determine the *in vivo* effect of

copaiba oil, both in the prevention and as an adjuvant to the treatment of mammary cancer.

References

- BARROS, A. C. S. D., MURANAKA, E. NA. K., MORI L. J., PELIZON, C.H. T., IRIYA, K., GIOCONDO, G., PINOTTI, J. A. Induction of experimental mammary carcinogenesis in rats with 7,12-dimethylbenz(a)anthracene. **Revista Hospital Clínicas. Faculdade Medicina. São Paulo**. 59(5):257-261, 2004.
- BUB A., BARTH SW, WATZL B, BRIVIBA K, RECHKEMMER G. Paraoxonase 1 Q192R (PON1–192) polymorphism is associated with reduced lipid peroxidation in healthy young men on a low-carotenoid diet supplemented with tomato juice. *Br J Nutr* 2005; 93: 291–297
- BOBIN-DUBIGEON, C.; JAFFRÉ, I.; JOALLAND, M.P.; CLASSE, J.M.; CAMPONE, M.; HERVÉ, M.; BAR, J. M. Paraoxonase 1 (PON1) as a marker of short term death in breast cancer recurrence. **Clinical Biochemistry**. n. 45, p. 1503–1505, 2012.
- CASSALI G. D.; LAVALLE, G. E.; DE NARDI, A. B.; et al Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**. v. 4, n. 2, p. 153-180, 2011.
- CONKLIN, K.A. Chemotherapy-associated oxidative stress: impact on chemotherapeutic effectiveness. **Integrative Cancer Therapies**. n.3, p.294–300, 2004.
- COSTA-SILVA, J.H.; LYRA, M.M.A.; LIMA, C.R.; ARRUDA, V.M.; ARAÚJO, A.V.; RIBEIRO, A.R.; ARRUDA, A.C.; FRAGA, M.C.C.A.; LAFAYETTE, S.S.L. Estudo Toxicológico Reprodutivo da Carapa guianensis Aublet (Andiroba) em Ratas Wistar. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, v. 23, n. 3, p. 425-428, 2006.
- CUNHA, L.C.; AZEREDO, F.S.; MENDONÇA, A.C.V.; VIEIRA, M.S.; PUCCI, L.L.; VALADARES, M. C.; FREITAS, H. O. G.; SENA, A. S.; LINO, R. S. Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v.119, n.2, p.403-411, 2009.
- GOMES, NIELE MATOS; REZENDE, CLAUDIA MORAES; FONTES, SILVIA PAREDES; MATHEUS, MARIA ELINE; FERNANDES, PATRICIA DIAS.

- Antinociceptive activity of Amazonian Copaiba oils. *Journal of Ethnopharmacology* 109 (2007) 486–492
- GROSSELIN K, MARTIEN S, POURTIER A, et al. Senescence-associated oxidative DNA damage promotes the generation of neoplastic cells. **Cancer Research**. n. 69, p. 7917–25, 2009.
- INCA – INSTITUTO NACIONAL DO CANCER. <http://www2.inca.gov.br> acesso em: 17 de abril de 2012.
- ISHII K, ZHEN LX, WANG DH, FUNAMORI Y, OGAWA K, TAKETA K. Prevention of mammary tumorigenesis in acatalasemic mice by vitamin E supplementation. **Japanese Journal of Cancer Research**. n.87, p.680–4, 1996.
- LIMA, S. R. M.; VEIGA JUNIOR, V. F.; CHRISTO, H. B.; PINTO, ANGELO C.; FERNANDES, PATRICIA D. In vivo and in vitro Studies on the Anticancer Activity of *Copaifera multijuga* Hayne and its Fractions. *PHYTOTHERAPY RESEARCH*. 17, 1048–1053 (2003)
- OZBEN, T. Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy. **Journal of Pharmaceutical Science**. n. 96, p. 2181–96, 2006.
- PANIS, C.; VICTORINO, V. J.; HERRERA, A.C.S.A.; FREITAS, L.F.; DE ROSSI, T.; CAMPOS, F.C.; COLADO SIMÃO. A.N.; BARBOSA, D.S.; PINGE-FILHO, P.; CECCHINI, R.; CECCHINI, A.L. B. **Differential oxidative status and immune characterization of the early and advanced stages of human breast cancer**. 2011 DOI: 10.1007/s10549-011-1851-1
- REZENDE LF, COSTA ECS, SCHENKA NGM, SCHENKA AA, UNTURA LP, UEMURA G. Modelo experimental de carcinoma mamário em ratas induzidas com 7,12-dimetilbenz(a) antraceno. **Revista Brasileira Mastologia**. 2010;20(2):76-79.
- Riss, T. L., Moravec, R. A.; Niles, A. L.; Benink, H. A.; Worzella, T. J; Minor, L. Cell Viability Assays. in **Assay Guidance Manual**. Sittampalam GS, Gal-Edd N, Arkin M, et al., editors. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004
- ROSSI, GABRIELE; GIORDANO, ALESSIA; PEZZIA,FRANCESCA; KJELGAARD-HANSEN; PALTRINIERI, MADS SAVERIO. Serum paraoxonase 1 activity in dogs: preanalytical and analytical factors and correlation with C-reactive protein and alpha-2-globulin. *Vet Clin Pathol* 42/3 (2013) 329–341 ©2013
- SACHETTI,CAMILE GIARETTA; FASCINELI,MARIA LUIZA; SAMPAIO,JULIANA ALVES; LAMEIRA,OSMAR ALVES; CALDA, ELOISA DUTRA. Avaliação da

toxicidade aguda e potencial neurotóxico do óleo-resina de copaíba (*Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae). *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 19(4): 937-941, Out./Dez. 2009

SANTOS JUNIOR, H.M.; OLIVEIRA, D.; CARVALHO, D.A.; PINTO, J.M.A.; CAMPOS, V.A.C.; MOURÃO, A.R.B.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V. Evaluation of native and exotic Brazilian plants for anticancer activity. 2010 DOI: 10.1007/s11418-010-0390-0

Sousa, J. P. B.; Brancalion, A. P.S.; Souza, A. B.; Turatti, I.C.C. Validation of a gas chromatographic method to quantify sesquiterpenes in copaiba oils. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. n. 54, p.653–659, 2011.

TUROLLA, M.S.R.; NASCIMENTO, E.S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 42, n.2, p.289-306, 2006.

VERA-RAMIREZ, L.; ROVIRA, P.S.; RAMIREZ-TORTOSA, M.C.; RAMIREZ-TORTOSA, C.L.; GRANADOS-PRINCIPAL, S.; LORENTE, J.A.; QUILES, J.L. Free radicals in breast carcinogenesis, breast cancer progression and cancer stem cells. Biological bases to develop oxidative-based therapies. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**. 2011. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2011.01.004

VEIGA JUNIOR, V.F.; ROSAS, E.C.; CARVALHO, M.V.; HENRIQUES, M.G.M.O.; PINTO, A. C. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne—A comparative study **Journal of Ethnopharmacology**. n. 112, p. 248–254, 2007.

Wafa S. Al-Dhaheri,^a Imam Hassouna,^b Suhail Al-Salam,^c and Sherif M. Karama Characterization of Breast Cancer Progression in the Rat *Annals of the New York Academy of Sciences* 1138: 121–131 (2008)

WANG, J.; RUAN, Y.; CAI, Q.; HAIXING, X.; YUN-XIA, W. In vitro and in vivo evaluation of the wound healing properties of *Siegesbeckia pubescens*. *Journal of ethnopharmacology*. v.134, p.1033-1038, 2011.

YOUNES R.N, VARELLA A.D., SUFREDINI I.B. (2000) Seleção, extração e identificação de drogas novas anticâncer de plantas brasileiras. *Acta Oncologica Brasileira* 20:15–19

4 CONCLUSÕES

- Cães portadores de tumores mamários apresentam atividade de PON1 e CAT reduzidas quando comparados com animais hígidos;

- Não há relação entre o tipo tumoral com a atividade de PON1 e com a CAT;

- A dose citotóxica do óleo resina de copaíba é de uma diluição de 0,001% no meio de cultura;

- O óleo resina de copaíba é capaz de inibir o crescimento de linhagem celular de tumor mamário humano (MCF-7) em diluições maiores que a citotóxica. A diluição mais alta aferida, a qual ainda foi capaz de inibir o crescimento, foi de 0,000001% no meio de cultura;

- Doses iguais ou maiores a 0,6g/kg de óleo resina de copaíba são capazes de levar a óbito todos os animais avaliados. A dose de 0,3g/kg é segura e não apresenta toxicidade hepática nem após 175 dias de tratamento;

- O óleo resina de copaíba não é capaz de reduzir o número de tumores induzidos quimicamente em modelo animal;

- Não houve diferença na atividade de PON1 em modelos biológicos com e sem tumor induzidos quimicamente, tratados com óleo resina de copaíba.

4.1 Conclusão geral

É possível concluir que cães com tumores de mama possuem uma redução na sua capacidade de controle do estresse oxidativo, visto que tanto a capacidade antioxidante total e a atividade da PON1 estão significativamente reduzidas nestes pacientes. Além disso, o óleo resina de copaíba se mostrou um potencial aliado na terapia adjuvante contra o tumor de mama, considerando que ele foi capaz de inibir o crescimento *in vitro* de células tumorais e não foi tóxico em doses reduzidas quando utilizado *in vivo*.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRANCALION, A. P. S.; OLIVEIRA, R. B.; SOUSA, J. P. B.; GROppo, M.; BERRETTA, A. A.; BARROS, M. E.; BOIM, M. A.; BASTOS, J. K. Effect of hydroalcoholic extract from *Copaifera langsdorffii* leaves on urolithiasis induced in rats. **Urology Research**. n. 40, p. 475–481, 2012. DOI 10.1007/s00240-011-0453-z.

BOBIN-DUBIGEON, C.; JAFFRÉ, I.; JOALLAND, M.P.; CLASSE, J.M.; CAMPONE, M.; HERVÉ, M.; BAR, J. M. Paraoxonase 1 (PON1) as a marker of short term death in breast cancer recurrence. **Clinical Biochemistry**. n. 45, p. 1503–1505, 2012.

CASSALI G. D.; LAVALLE, G. E.; DE NARDI, A. B.; et al Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**. v. 4, n. 2, p. 153-180, 2011.

CASSALI G.D., BERTAGNOLLI A.C., LAVALLE G.E., TAVARES W.L.F., FERREIRA E., SILVA A.E., CAMPOS C.B. Perspectives for diagnosis, prognosis and treatment of mammary 1181 neoplasms in dogs. **Proceedings of the 34th World Small Animal Veterinary Congress - WSAVA 2009**, 2009.

CHEN-CHEN, L.; SENA, M.A. Atividade toxica e mutagênica do óleo de copaiba (*Copaifera langsdorffii* Desfon) em camundongos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. 5, 37–40. 2002,

CONKLIN, K.A. Chemotherapy-associated oxidative stress: impact on chemotherapeutic effectiveness. **Integrative Cancer Therapies**. n.3, p.294–300, 2004.

FANG, DAI-HUA; FAN, CONG-HAI; JI, QIANG; QI, BO-XIANG; LI, JUAN; WANG, LU. Differential effects of paraoxonase 1 (PON1) polymorphisms on cancer risk: evidence from 25 published studies. **Molecular Biology Reproduction** n. 39, p. 6801–6809, 2012.

FIGHERA R.A., SOUZA T.M., SILVA M.C., BRUM J.S., GRAÇA D.L., KOMMERS G.D., IRIGOYEN L.F.; BARROS C.S.L.. Causas de morte e razões para eutanásia de cães da Mesorregião do Centro Ocidental Rio Grandense (1965-2004). **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 28, n. 4, p. 223-230. 2008

FERRARI, C. K. B.. Total antioxidant capacity (TAC) in clinical, experimental and nutritional studies. **Journal of the Health Sciences**. n, 28, p.307-10, 2010.

GORDON, I.; KHANNA, C. Modeling opportunities in comparative oncology for drug development. **ILAR Journal**. n.51, p. 214-220. 2010.

GROSSELIN K, MARTIEN S, POURTIER A, et al. Senescence-associated oxidative DNA damage promotes the generation of neoplastic cells. **Cancer Research**. n. 69, p. 7917–25, 2009.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiology** n.141, p. 312–22, 2006

HENNIGHAUSEN, L. Mouse models for breast cancer. **Breast Cancer Research**. n. 2, p.2-7, 2000.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DO CANCER. <http://www2.inca.gov.br> acesso em: 17 de abril de 2012.

ISHII K, ZHEN LX, WANG DH, FUNAMORI Y, OGAWA K, TAKETA K. Prevention of mammary tumorigenesis in acatalasemic mice by vitamin E supplementation. **Japanese Journal of Cancer Research**. n.87, p.680–4, 1996.

MAISTRO, E.L.; CARVALHO, J.C.T.; CASCON, V.; KAPLAN, M.A.C. *In vivo* evaluation of the mutagenic potential and phytochemical characterization of oleoresin from *Copaifera duckei* Dwyer. **Genetic Molecular Biology**. 28, 833–838. 2005.

MARCHESI, M.C.; CONTI, M.B.; PIERAMATI, C.; MANGILI, V.; FRUGANT, G. Assessment and Behavior of Alphafetoprotein (AFP), Antigen Cancer 15/3 (CA 15/3), Carcineembryonal Antigen(CEA) in Clinical Oncology of the Dog: Preliminary Study. **Veterinary Research Communications**, v. 31, n. 1, p. 301–304, 2007. DOI: 10.1007/s11259-007-0052-1

MISDORP W., ELSE RW., HELLMÉN E., LIPSCOMB E. Definitions and explanatory notes. 1406 Who Histological Classification of Mammary Tumors of the Dog and Cat. Washington: Armed 1407 Forces Institute of Pathology, 1999, 18-27.

MOLINA, R.; BARAK, V.; DALEN, A.; DUFFY, M. J.; EINARSSON, R.; GION, M.; GOIKE, H.; LAMERZ, R.; NAP, M.; SÖLÉTORMOS, G.; STIEBER, P. Tumor Markers in Breast Cancer – European Group on Tumor Markers Recommendations - **Tumor Biology**. n. 26, p.281–293, 2005. DOI: 10.1159/000089260

MOLINA, R.; AUGÉ, J. M.; ESCUDERO, J. M.; FILELLA, X.; ZANON, G.; PAHISA, J.; FARRUS, B.; MUÑOZ, M.; VELASCO, M. Evaluation of tumor markers (HER-2/neu oncoprotein, CEA, and CA 15.3) in patients with locoregional breast cancer: prognostic value. **Tumor Biology**. n. 31, p. 171-180, 2010. DOI 10.1007/s13277-010-0025-9.

MOULTON, C. J.; VALENTINE, R. J.; LAYMAN, D. K.; DEVKOTA, S.; SINGLETARY, K. W.; WALLIG, M.A.; DONOVAN, S.M. A high protein moderate carbohydrate diet fed at discrete meals reduces early progression of N-methyl-N-nitrosourea-induced breast tumorigenesis in rats. *Nutrition & Metabolism*, 7:1 <http://www.nutritionandmetabolism.com/content/7/1/1> 2010

MULAS, J. M.; ORDÁS, J.; MILLÁN, Y.; FERNÁNDEZ-SORIA, V.; RAMÓN, S. Oncogene HER-2 in canine mammary gland carcinomas: An immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. **Breast Cancer Research and Treatment**. n. 80, p. 363–367, 2003.

NOWSHEEN, S.; WUKOVICH, R.L.; AZIZ, K. Accumulation of oxidatively induced clustered DNA lesions in human tumor tissues. **Mutation Research**. n. 674, p.131–62, 2009.

OZBEN, T. Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy. **Journal of Pharmaceutical Science**. n. 96, p. 2181–96, 2006.

PANIS, C.; VICTORINO, V. J.; HERRERA, A.C.S.A.; FREITAS, L.F.; DE ROSSI, T.; CAMPOS, F.C.; COLADO SIMÃO, A.N.; BARBOSA, D.S.; PINGE-FILHO, P.; CECCHINI, R.; CECCHINI, A.L. B. **Differential oxidative status and immune characterization of the early and advanced stages of human breast cancer**. 2011 DOI: 10.1007/s10549-011-1851-1

PERŠE, M.; CERAR, A.; INJAC, R.; ŠTRUKELJ, B. N-methylnitrosourea induced breast cancer in rat, the histopathology of the resulting tumours and its drawbacks as a model. *Pathology Oncology Research*. v 15:115–121.2009. DOI 10.1007/s12253-008-9117-x.

PINHO, S.S.; CARVALHO, S.; CABRAL, J.; REIS, C.A.; GARTNER, F. **Canine tumors: a spontaneous animal model of human carcinogenesis**. 2012 DOI: 10.1016/j.trsl.2011.11.005

SANTOS, A. O.; COSTA, M. A.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS-FILHO, B. P.; VEIGA-JÚNIOR, V. F.; LIMA, M. M. S.; NAKAMURA, C. V. *Leishmania amazonensis*: Effects

of oral treatment with copaiba oil in mice. **Experimental Parasitology**. n. 129, p.145–151, 2011.

SANTOS JUNIOR, H.M.; OLIVEIRA, D.; CARVALHO, D.A.; PINTO, J.M.A.; CAMPOS, V.A.C.; MOURÃO, A.R.B.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V. **Evaluation of native and exotic Brazilian plants for anticancer activity**. 2010 DOI: 10.1007/s11418-010-0390-0

SENER, D.E.; GÖNENC, A.; AKINCI, M.; TORUN, M. Lipid peroxidation and total antioxidant status in patients with breast cancer. **Cell Biochemistry Function**. n. 25, p. 377–82, 2007.

SLATTER, D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. 3 ed. Vol 1. São Paulo: Manole, 1998

THOMPSON, H.J.; ADLAKHA, H. Dose-responsive induction of mammary gland carcinomas by the intraperitoneal injection of 1-methyl-1-nitrosourea. **Cancer Research**. v. 51:3411-3415. 1991.

THOMPSON, H.J.; SINGH, M. Rat models of premalignant breast disease. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, Vol. 5, No. 4, 2000

THOMPSON, H.J.; SINGH, M.; MCGINLEY, J. Classification of premalignant and malignant lesions developing in the rat mammary gland after injection of sexually immature rats with 1-methyl-1-nitrosourea. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, Vol. 5, No. 2, 2000

VERA-RAMIREZ, L.; ROVIRA, P.S.; RAMIREZ-TORTOSA, M.C.; RAMIREZ-TORTOSA, C.L.; GRANADOS-PRINCIPAL, S.; LORENTE, J.A.; QUILES, J.L. Free radicals in breast carcinogenesis, breast cancer progression and cancer stem cells. Biological bases to develop oxidative-based therapies. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**. 2011. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2011.01.004

YOUNES R.N, VARELLA A.D., SUFREDINI I.B. (2000) Seleção, extração e identificação de drogas novas anticâncer de plantas brasileiras. **Acta Oncologica Brasileira** 20:15–19

YURI, T.; LAI, YEN-C.; KANEMATSU, S.; KUWATA, M.; YOSHIZAWA, K.; TSUBURA, A. Effects of short-term estrogen treatment on the progression of N-methyl-Nnitrosourea- induced premalignant mammary lesions in female Lewis rats. **Medical Molecular Morphology**. v44:125–130 2011 DOI 10.1007/s00795-010-0515-2.