



UNESP - Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araraquara



NICOLE CASALLE

**SUSCEPTIBILIDADE DE CARCINOMA ESPINOCELULAR ORAL AO ÓLEO
ESSENCIAL DE *MELALEUCA ALTERNIFOLIA* E SUAS PRINCIPAIS
PORÇÕES SOLÚVEIS**

Araraquara

2016



UNESP - Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”



Faculdade de Odontologia de Araraquara

NICOLE CASALLE

**SUSCEPTIBILIDADE DE CARCINOMA ESPINOCELULAR ORAL AO ÓLEO
ESSENCIAL DE *MELALEUCA ALTERNIFOLIA* E SUAS PRINCIPAIS
PORÇÕES SOLÚVEIS**

Dissertação apresentada ao programa de
Pós-Graduação em Ciências
Odontológicas, Área de Diagnóstico Bucal,
da Faculdade de Odontologia de
Araraquara, da Universidade Estadual
Paulista - UNESP, para obtenção do título
de Mestre em Ciências Odontológicas.

Orientador: Prof. Dr. Cleverton Roberto de Andrade

Araraquara

2016

Casalle, Nicole

Susceptibilidade de carcinoma espinocelular oral ao óleo essencial de *Melaleuca Alternifolia* e suas principais porções solúveis / Nicole Casalle.-- Araraquara: [s.n.], 2016.

48 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia

Orientador: Prof. Dr. Cleverton Roberto de Andrade

1. Carcinoma de células escamosas 2. Óleo de melaleuca
3. Sobrevivência celular 4. Testes para micronúcleos I. Título

NICOLE CASALLE

**SUSCEPTIBILIDADE DE CARCINOMA ESPINOCELULAR ORAL AO ÓLEO
ESSENCIAL DE *MELALEUCA ALTERNIFOLIA* E SUAS PRINCIPAIS
PORÇÕES SOLÚVEIS**

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Presidente e orientador: Prof. Dr. Cleverton Roberto de Andrade

2º Examinador: Profa. Dra. Christiane Pienna Soares

3º Examinador: Profa. Dra. Elaine Maria Sgavioli Massucato

Araraquara, 30 de setembro de 2016.

DADOS CURRICULARES

NICOLE CASALLE

NASCIMENTO: 22 de setembro de 1989 – Araraquara - SP

FILIAÇÃO: Carlos Alberto Casalle e Maria Elisabete Corbi Casalle

FORMAÇÃO

1996/2004	Ensino Fundamental (1º grau) - Colégio Progresso de Araraquara- SP
2005/2007	Ensino Médio (2º grau) - Colégio Pablo Neruda- Araraquara- SP
2008/2012	Graduação em Odontologia. - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", UNESP, Araraquara, SP, Brasil
2014/2016	Mestrado em Ciências Odontológicas, área de Diagnóstico Bucal

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2009/2010	Bolsista de iniciação científica PIBIC/CNPq na Disciplina de Dentística Restauradora- Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
2011/ 2012	Bolsista de iniciação científica FAPESP na Disciplina de Prótese Total- Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

*Este trabalho é dedicado com muito amor à
minha amada Vó Maria e à meus pais, que sempre me
apoiam e estiveram comigo em todos os momentos
importantes da minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado a vida, saúde e condições para que eu realizasse os meus sonhos.

Em especial, agradeço a minha mãe e ao meu pai, por terem sido sempre tão presentes e por não me deixarem desistir dos meus objetivos.

Agradeço a Faculdade de Odontologia de Araraquara, por ter me recebido de maneira tão maravilhosa. Por ser onde passei os melhores anos da minha vida e por continuar fornecendo as bases que eu necessito para seguir minha carreira.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Cleverton Roberto de Andrade, por ter me recebido como aluna de mestrado. Que possamos colher os frutos do trabalho que desenvolvemos juntos.

Agradeço a Profa. Dra. Elaine Maria Sgavioli Massucato, por estar sempre presente, desde o começo do meu trabalho, por oferecer sua ajuda sempre que necessário. Grande professora e grande pessoa, um exemplo para todos.

Agradeço a Profa. Dra. Christianne Pienna Soares, por abrir as portas para mim no Laboratório de Citologia, por ter feito parte da minha banca de qualificação e defesa, e sempre contribuir muito com os seus conselhos e observações sempre pertinentes.

Agradeço as meninas da farmácia Thaís Moreira e Juliana Sorbo, pelas várias vezes em que me ajudaram, sempre com muita paciência. Que vocês tenham muito sucesso, tenho certeza que irão longe.

Agradeço a Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida, por ter permitido que minhas análises fossem feitas no Núcleo de Proteômica. E agradeço muito a Cláudia Tavares, pessoa maravilhosa que me ajudou a realizar e analisar a maioria dos experimentos.

Ao Prof. Dr. Ricardo Della Coletta, por tão gentilmente fornecer as linhagens celulares para que esse trabalho pudesse ser feito.

À Coordenação da Pós-Graduação do programa Ciências Odontológicas da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP.

Agradeço a agência de fomento CNPq, pela concessão da bolsa de Mestrado durante dois anos. Processo: 133801/2014-4.

Agradeço a minha avó Maria, vó Nair, vô Candoca e vô Bem (em memória), por sempre acreditaram em mim e celebrarem cada vitória minha, como se fossem de vocês.

Agradeço aos meus amigos, impossível citar todos os nomes, mas em especial à Carolzinha Mendes e Cá Lorenzetti, por terem me dado força nos momentos mais difíceis que enfrentei no mestrado. E também à Malu Monteiro, por seus inúmeros conselhos que sempre me fizeram seguir em frente e ver o lado bom de tudo.

Por fim, agradeço novamente aos meus pais e ao meu irmão por estarem do meu lado em todos os momentos, principalmente nos difíceis. Vocês são as pessoas mais importantes da minha vida.

“Quando um pássaro está vivo, ele come as formigas, mas quando o pássaro morre, são as formigas que o comem. Tempo e circunstâncias podem mudar a qualquer minuto. Por isso, não desvalorize ou machuque ninguém e nenhuma coisa à sua volta. Você pode ter poder hoje, mas, lembre-se: O tempo é mais precioso do que qualquer um de nós! Saiba que uma árvore faz um milhão de fósforos, mas basta um fósforo para queimar milhões de árvores. Portanto, seja bom. Faça o bem!”

Casalle N. Susceptibilidade de carcinoma espinocelular oral ao óleo essencial de *Melaleuca Alternifolia* e suas principais porções solúveis [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2016.

RESUMO

O óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil – TTO) é composto por aproximadamente 100 componentes, sendo que os de maior concentração são o terpinen-4-ol e gama-terpineno. Os estudos da sua capacidade citotóxica têm demonstrado efeito sobre linhagens neoplásicas malignas. O objetivo do trabalho foi avaliar a capacidade citotóxica e mutagênica do TTO e seus componentes, terpinen-4-ol e gama terpineno em culturas celulares. Duas linhagens de carcinomas espinocelulares orais e uma linhagem de ceratinócitos foram analisadas por: (1) Análise colorimétrica de Metiltetrazolium (MTT); (2) Teste do Micronúcleo. Os resultados foram expressos na forma de ensaios de susceptibilidade e grau de mutagenicidade. Posteriormente foram analisados por *one-way* Anova com pós-teste de Tukey. Os valores de IC₅₀ obtidos nas análises de MTT das células expostas ao TTO foram de 0,2% para a HaCaT, 0,14% para a HSC-3 e 0,17% para a SCC-25. Para a exposição ao terpinen-4ol, os valores de IC₅₀, foram 0,5%, 0,3% e 0,45% para as linhagens HaCaT, HSC-3 e SCC-25, respectivamente. O gama-terpineno, não demonstrou atividade citotóxica expressiva, não sendo possível calcular o IC₅₀. O TTO não demonstrou mutagenicidade nas linhagens HaCaT e HSC-3. O terpinen-4-ol, não foi capaz de produzir mutagenicidade em nenhuma das linhagens em estudo. Conclui-se que tanto o TTO quanto o terpinen-4-ol apresentam capacidade citotóxica sobre as linhagens HaCaT, HSC-3 e SCC-25. O TTO não foi mutagênico nas linhagens HaCaT e HSC-3. O terpinen-4-ol não foi mutagênico em nenhuma das linhagens testadas.

Palavras chave: Carcinoma de células escamosas. Óleo de melaleuca. Sobrevivência celular. Testes para micronúcleos.

Casalle N. Susceptibility of oral squamous cell carcinoma to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* and main soluble componentes [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2016

ABSTRACT

The essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil - TTO) consists of about 100 components, and the highest concentration are terpinen-4-ol and gamma-terpinene. Studies of their cytotoxic capacity have shown effect on malignant neoplastic lineages. The aim of this study was to evaluate the cytotoxic and mutagenic capacity of TTO and main soluble components, terpinen-4-ol and gama-terpinene in cell cultures. Two lineages of oral squamous cell carcinoma and a keratinocyte cell were analyzed: (1) colorimetric analysis Metiltetrazolium (MTT); (2) Micronucleus assay. The results were expressed as susceptibility tests and degree of mutagenicity. The statistical test used in the analysis was *one-way* ANOVA (Tukey test). The IC₅₀ values obtained from the MTT analysis of cells exposed to TTO were 0.2% for HaCaT, 0.14% for HSC-3, and 0.17% for SCC-25. For exposure to terpinen-4ol, IC₅₀ values were 0.5%, 0.3% and 0.45% for HaCaT, HSC-3 and SCC-25, respectively. The gamma-terpinene didn't show significant cytotoxic activity, therefore it was impossible to calculate the IC₅₀. The TTO was unable to produce mutagenicity in HSC-3 and HaCaT. The terpinen-4-ol was not mutagenic in any of the lineages tested. In conclusion, both the TTO and terpinen-4-ol had cytotoxic capacity on HaCaT, HSC-3 and SCC-25. The TTO was unable to produce mutagenicity in HSC-3 and HaCaT. The terpinen-4-ol was not mutagenic in any of the lineages tested.

Keyword: Carcinoma, Squamous cel. Tea tree oil. Cell Survival. Micronucleus tests.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – análise de variância

C- curcumina

CEC- carcinoma espinocelular

CIT-B- citocalasina B

CN – controle negativo

CP – controle positivo

CPA- controle positivo de apoptose

CPN- controle positivo de necrose

CV- controle de veículo

D- doxorubicina

DMEM – dulbecco's modification of eagle's médium

DMSO- dimetilsulfóxido

EP - erro padrão

FITC - isotiocianato de fluoresceína

FS- fosfatidilserina

F12- nutrient mixture

HaCaT- Human Keratinocyte Cell

HSC-3- human oral squamous cell carcinoma

IC50 – concentração capaz de reduzir em 50% a viabilidade celular

IP – iodeto de propídio

M- média

MN- micronúcleo

MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- brometo de difeniltetrazólio

PBS – solução salina tamponada com fosfato

p53- proteína p53

SCC-25- squamous cell carcinoma

SFB – soro fetal bovino

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	14
3 OBJETIVOS.....	19
3.1 Objetivo Geral.....	19
3.2 Objetivos Específicos.....	19
4 MATERIAL E MÉTODO.....	20
4.1 Óleo e Componentes do Óleo de <i>Melaleuca Alternifolia</i>	20
4.2 Linhagens Celulares.....	22
4.2.1 Carcinomas espinocelulares e ceratinócito imortalizado.....	22
4.2.2 Fase experimental das culturas celulares (CECs e HaCaT).....	22
4.3 Avaliação da Citotoxicidade em Culturas de Células.....	24
4.3.1 Análise colorimétrica de metiltetrazolium (MTT).....	24
4.4 Teste do Micronúcleo.....	26
4.5 In Cell Analyzer 2000.....	28
4.6 Forma de Análise dos Resultados.....	29
5 RESULTADO.....	30
5.1 Análise Colorimétrica de Metiltetrazolium (MTT).....	30
5.1.1 Resultados TTO e terpinen-4-ol.....	31
5.2 Teste do Micronúcleo.....	35
5.2.1 Resultados TTO.....	36
5.2.2 Resultados terpinen-4-ol.....	39
6 DISCUSSÃO.....	42
7 CONCLUSÃO.....	45
REFERÊNCIAS.....	46

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma das principais causas de morte em todo o mundo, a cada ano, 14.1 milhões de novos casos são diagnosticados e 8,2 milhões de pessoas morrem devido à doença^{13, 9}. No Brasil, em 2016 serão 596 mil casos novos, 295 mil em homens e 300 mil em mulheres. É a segunda maior causa de morte, com 190 mil óbitos por ano^{13, 6}.

No ano de 2012, os cânceres de boca foram estimados em 300 mil casos novos, dos quais, dois terços foram do sexo masculino. Para o mesmo ano, a estimativa de óbitos foi de 145 mil casos, com cerca de 80% ocorrendo em regiões menos favorecidas^{13, 2}.

No Brasil, o câncer de cavidade oral está entre os 10 tumores malignos mais prevalentes. Em homens a estimativa para 2016 é de 11.140 casos (5,2%), sendo o quinto tumor maligno mais comum. Em mulheres serão 4.350 casos, sendo o 12º tumor maligno mais frequente¹³. Estes dados demonstram claramente a importância do estudo destes tumores, mais ainda quando comparamos sua prevalência relativa no Brasil e no mundo, respectivamente 2,4% e 2,1%⁹.

Por consequência, estudos tentam identificar novas opções de tratamento que possam melhorar a sobrevida dos pacientes com carcinoma espinocelular (CEC) de boca^{21, 19}. Neste contexto, foram realizados experimentos com substâncias de origem vegetal com o intuito de identificar novas drogas de potencial uso, como auxiliares ao tratamento atualmente preconizado^{5, 10}. De fato, novos quimioterápicos extraídos, originalmente de plantas continuam entrando no mercado e vem sendo analisados quanto a sua utilidade contra diferentes neoplasias, incluindo o carcinoma espinocelular.

A *Melaleuca alternifolia* é um fitoterápico que se destaca em diferentes estudos para fins medicinais. O óleo essencial de melaleuca (tea tree oil – TTO) é composto por uma complexa mistura de aproximadamente 100 componentes⁴, dos quais os componentes de maior concentração são o terpinen-4-ol (39-48%), gama-terpineno (17-18%) e alfa-terpineno (8-13%). O óleo é considerado não

tóxico de odor agradável, sendo utilizado largamente em produtos com finalidade reparadora ou anti-infecciosa. Sua capacidade lipofílica e consequente penetração na pele sugerem possibilidade de uso tópico ^{25, 17}.

A capacidade citotóxica do TTO e do terpinen-4-ol contra diferentes linhagens celulares malignas vem sendo avaliada ¹². Entretanto, não existem estudos que tenham analisado a capacidade citotóxica do TTO e seus componentes de maior concentração sobre linhagens celulares provenientes de carcinomas espinocelulares orais ou outros tumores malignos de boca. Sendo assim, consideramos importante o estudo destas substâncias sobre linhagem celular proveniente desta região.

Para tanto, alguns parâmetros podem ser avaliados em experimentos in vitro. Este trabalho avaliou dois deles. O primeiro relacionado com a possível alteração da atividade mitocondrial, que avaliou a viabilidade celular e norteou as concentrações necessárias para o próximo experimento (respiração oxidativa, ensaio de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil-2H tetrazolato de bromo - MTT] ³. O segundo avaliou se o efeito citotóxico propiciou lesão nuclear, causando danos a nível cromossômico, essas mutações cromossômicas são fatores essenciais para a carcinogênese e foi analisado pelo teste de Micronúcleo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Em um estudo in vitro, Calcabrini et al.⁵ (2004), analisaram a atividade anti-tumoral do óleo essencial TTO (tea tree oil) e seu principal componente, terpinen-4-ol, contra células de melanoma humano M14 WT e suas variáveis resistentes aos fármacos, M14- adriamicina resistente. As células foram cultivadas na presença do TTO e terpinen-4-ol, em concentrações que variaram de 0,005-0,03%. As duas substâncias testadas foram capazes de induzir apoptose nas células malignas, pela ativação da via de caspases e este efeito foi mais evidente na população de células resistentes. As análises feitas pelo microscopia eletrônica de varredura por criofratura, sugeriram que o efeito do TTO e do terpinen-4-ol, foi mediado pela interação com a membrana plasmática e com a reorganização dos lipídeos presentes na membrana. Os autores concluíram que ambas as substâncias foram capazes de diminuir o crescimento das células de melanoma humano M14 e pareceram ser mais eficazes sobre a variável resistente.

Hammer et al.¹² (2006), fizeram uma revisão sobre a citotoxicidade do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil- TTO). Baseados na literatura presente, concluíram que o TTO é definitivamente tóxico quando ingerido em altas doses, podendo causar irritação cutânea em altas concentrações e desenvolver alergias em pacientes com pré-disposição. Contudo, os dados indicam que a toxicidade do TTO é dose-dependente, e que a maioria dos efeitos adversos podem ser evitados através da utilização de concentrações mais baixas, com exceção das reações alérgicas, que ocorrem de forma muito ocasional e podem ser causadas pelos produtos de oxidação formados por exposição à luz e/ou ar. Os autores relataram não haver dados suficientes sobre a toxicidade sistêmica do TTO. Concluíram que o uso tópico do TTO é realizado por quase 80 anos, sugerindo uma segurança relativa do mesmo, pois os eventos adversos são menores, auto-limitantes e ocasionais. Os autores também afirmaram que reações adversas podem ser minimizadas evitando a ingestão, diluindo-se o óleo no uso tópico e mantendo o armazenamento correto do mesmo. Também relatam haver pouca evidência sobre o potencial genotóxico do TTO e sua capacidade ecotóxica, sugerindo que há a necessidade de mais estudos.

Greay et al.¹⁰ (2009) analisaram a indução de necrose e interrupção do ciclo celular em linhagens de células malignas de ratos (mesotelioma AE17 e melanoma B16), utilizando TTO e terpinen-4-ol. Foi realizado o ensaio de MTT e indução de necrose e apoptose por citometria de fluxo. O estudo mostrou que tanto o TTO, quanto o terpinen-4-ol tiveram atividade antiproliferativa e antitumoral significativa contra as duas linhagens tumorais. Além disso, observaram menores concentrações tóxicas para células tumorais quando comparadas com fibroblastos normais.

Bozzuto et al.³ (2010) analisaram a atividade antitumoral, através da migração e invasão de células de melanoma humano (M14WT) expostas a TTO ou terpinen-4-ol durante quimioterapia com adriamicina. Os autores relataram que o TTO provou ser capaz de inibir o crescimento das células malignas e das células resistentes a quimioterapia. Além disso, os autores concluíram que o TTO e terpinen-4-ol interferiram nos processos de migração e invasão de células de melanoma (sensíveis e resistentes a quimioterapia).

Greay et al.¹¹ (2010), em outro estudo, avaliaram in vivo, a inibição do crescimento de linhagens de células malignas de ratos (mesotelioma AE17 e melanoma B16-F10) após exposição tópica ao óleo de *Melaleuca alternifolia*. Formulações tópicas foram aplicadas em camundongos imunocompetentes, portadores de células tumorais, e o crescimento do tumor foi monitorado e analisado histologicamente após o tratamento. Aplicações tópicas, quatro vezes ao dia, de 10% de TTO/DMSO, regrediram as células de mesotelioma subcutâneo AE17 em um período de 10 dias, e retardaram significativamente o crescimento de células de melanoma subcutâneo B16-F10. O efeito antitumoral da aplicação tópica de 10% de TTO/DMSO foi acompanhado de irritação da pele, semelhante a outros agentes quimioterápicos, porém esses sintomas reduziram completamente e de forma mais rápida. Além disso, os autores mostraram que a aplicação tópica do TTO/DMSO causou maior fluxo de neutrófilos e de outras células de defesa imunológica na região tratada, sem evidência de toxicidade sistêmica. Os autores concluíram que o TTO combinado com DMSO, inibiu o crescimento de tumores subcutâneos agressivos quimio-resistentes em ratos imunocompetentes. Estes resultados destacaram o potencial da aplicação do TTO, como um tratamento antitumoral tópico alternativo.

Wu et al.²⁶ (2012), estudaram in vitro e in vivo a capacidade antitumoral

do terpinen-4-ol sobre células humanas de câncer de pulmão (A549 e CL1-0), e seu efeito na indução de apoptose após sua exposição. Os resultados indicaram que o terpinen-4-ol induziu efeito citotóxico dose-dependente, determinado pelo ensaio de MTT. As porcentagens de morte por apoptose precoce, tardia ou por necrose, também se mostraram dose-dependentes em ambas as linhagens. Entretanto na linhagem CL1-0, as porcentagens de morte por apoptose precoce aumentaram em doses mais baixas de terpinen-4-ol e caíram ligeiramente nas doses maiores, enquanto que os percentuais de apoptose tardia e necrose aumentaram de forma dose-dependente. Isso foi atribuído à sua maior sensibilidade para terpinen-4-ol, assim fazendo com que a fragmentação do DNA ocorresse mais cedo. Tomados em conjunto, estes resultados sugeriram que terpinen-4-ol induziu a apoptose nas células A549 e CL1-0. Notavelmente, terpinen-4-ol foi capaz de aumentar os níveis de p53 em células A549 e CL1-0. A diminuição de p53 por RNA de interferência induziu necrose em vez de apoptose em células A549 após o tratamento, o que indica que a apoptose por terpinen-4-ol é p53-dependente. Além disso, a administração intratumoral de terpinen-4-ol suprimiu significativamente o crescimento dos xenoinxertos de A549 por indução de apoptose, tal como confirmado por ensaio de TUNEL. Coletivamente, estes dados fornecem insights sobre os mecanismos moleculares apoptóticos subjacentes a exposição ao terpinen-4-ol em células humanas de câncer de pulmão, tornando este composto um potencial fármaco antitumoral contra essas células.

Khaw-on e Banjerdpongchai¹⁵ (2012), analisaram a indução de apoptose pelas vias intrínseca e extrínseca em células leucêmicas humanas MOLT-4, após exposição ao terpinen-4-ol. Os autores relataram que o terpinen-4-ol exibiu citotoxicidade nas células MOLT-4, com características morfológicas de apoptose, indicadas pela coloração de Wright. O modo de morte celular foi confirmado por análise de citometria de fluxo, após coloração com anexina V-FITC e iodeto de propídio. Foi observado um pico de células em sub-G1 durante o ensaio de ciclo celular. Afirmaram também que o terpinen-4-ol induziu apoptose das células MOLT-4 através de via intrínseca, envolvendo a perda de potencial da membrana mitocondrial e liberação de citocromo c para o citosol. Além disso, os autores relatam que o terpinen-4-ol também induziu apoptose por uma via extrínseca, através da ativação da caspase-8 e aumentou a via de

ativação da caspase- 3. Em conclusão, o estudo destacou que o terpinen-4-ol pode induzir apoptose de células leucêmicas humanas MOLT-4, através de vias extrínsecas e intrínsecas.

Em um estudo sobre a capacidade citotóxica e antitumoral da aplicação tópica do óleo de *Melaleuca alternifolia* em camundongos portadores de tumor subcutâneo, Ireland et al.¹⁴ (2012), examinaram o mecanismo de ação por trás da atividade antitumoral do TTO. As mudanças nas células imunológicas dos camundongos portadores de tumores subcutâneos após a aplicação tópica do TTO foram avaliadas por citometria de fluxo e imuno-histoquímica. A citotoxicidade direta do TTO em células tumorais in vivo foi avaliada por microscopia eletrônica de transmissão. Os autores relataram que houve acúmulo de neutrófilos na pele, após a exposição tópica de 10% de TTO/DMSO, mas que não são necessários na remoção do tumor, uma vez que a diminuição de neutrófilos não anula o efeito antitumoral. Relatam também que a aplicação do TTO diluído, não puro, induz acúmulo e ativação de células dendríticas e células T. Apesar da aplicação tópica de 10% de TTO/DMSO parecer ativar uma resposta imunológica, a eficácia antitumoral é mediada por efeitos diretos nas células tumorais in vivo. O efeito citotóxico direto do TTO in vivo, parece estar associado com a penetração do TTO. Os autores concluíram que estudos futuros devem ser focados na melhora da ação citotóxica direta do TTO, aumentando a penetração por meio da pele para atingir maior concentração de terpenos in situ. Esse efeito citotóxico acoplado com o aumento de uma resposta imunológica antitumoral mais específica, provavelmente resultará em longo prazo, no combate desses tumores.

Em 2013, Banjerdpongchai e Khaw-on ¹ realizaram um estudo para investigar a indução de morte celular por apoptose ou autofagia, através da exposição ao terpinen-4-ol e quais os mecanismos associados, em células leucêmicas humanas HL-60 e U937. A citotoxicidade do terpinen-4-ol sobre as linhagens foi determinado pelo ensaio de MTT, e a indução de morte celular foi determinada pelo via de ativação das caspases. O terpinen-4-ol exibiu citotoxicidade nas células HL-60, mas não nas U937. A resposta apoptótica ao terpinen-4-ol em células HL-60, ocorreu devido a liberação de citocromo c das mitocôndrias após a estimulação de caspase-8. A característica morfológica de

morte por autofagia foi demonstrada com vários autofagossomos no citoplasma. Os autores concluíram que o terpinen-4-ol produziu morte celular nas células leucêmicas humanas HL-60, tanto por autofagia, quanto por apoptose.

Shapira et al.²³(2016), estudaram o efeito antitumoral do terpinen-4-ol e o seu mecanismo de ação sobre células malignas gastrointestinais e de próstata. O terpinen-4-ol foi usado isoladamente, e em combinação com quimioterápicos e agentes biológicos. Os efeitos de morte foram medidos qualitativamente por microscopia de luz e quantitativamente usando a análise de MTT e FACS, seguindo o tratamento das linhagens celulares e foi utilizado o modelo de xenoenxerto para avaliar o desenvolvimento do tumor. O terpinen-4-ol induziu significativamente a inibição do crescimento das células malignas gastrointestinais e de próstata, de forma dose-dependente (10-90% em 0,005-0,1%). O terpinen-4-ol e vários agentes anti-câncer, demonstraram um efeito sinérgico de inibição (83% e 91%, respectivamente) da proliferação de células malignas. Os autores concluíram que o terpinen-4-ol aumenta significativamente o efeito de vários quimioterápicos e agentes biológicos. O possível mecanismo de ação envolve a indução de morte celular, tornando este composto um medicamento antitumoral em potencial, isoladamente ou em combinação, no tratamento de numerosas doenças malignas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a capacidade citotóxica e mutagênica do TTO e dos seus dois principais componentes (terpinen-4-ol e gama-terpineno) em culturas celulares de duas linhagens de carcinomas espinocelulares de cavidade oral e ceratinócitos imortalizados.

3.2 Objetivos Específicos

- Analisar a viabilidade celular de culturas de carcinomas espinocelulares orais e ceratinócitos imortalizados expostos ao TTO e obter o IC₅₀.
- Analisar a viabilidade celular de culturas de carcinomas espinocelulares orais e ceratinócitos imortalizados, expostos aos dois componentes de maior concentração no TTO, terpinen-4-ol e gama-terpineno, identificando qual destes componentes apresenta atividade semelhante ao TTO e obtendo o IC₅₀.
- Analisar a mutagenicidade da exposição ao TTO e seu principal componente em culturas de ceratinócitos imortalizados e carcinomas espinocelulares orais.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Óleo e Componentes do Óleo de *Melaleuca Alternifolia*

O gênero *Melaleuca*, pertencente à família *Myrtaceae*, inclui aproximadamente 100 espécies nativas da Austrália e Ilhas do Oceano Índico. *Melaleuca alternifolia* é comumente conhecida na Austrália como “árvore do chá”, florescendo principalmente em áreas de pântano, próximas de rios (Figura 1). O principal produto é o óleo essencial (TTO - tea tree oil), de grande importância medicinal por possuir comprovada ação bactericida e antifúngica contra diversos patógenos humanos, sendo utilizado em formulações tópicas. É extraído da planta por hidro destilação ou destilação por arraste a vapor ²⁰.

A composição do TTO (Sigma, MO, USA) foi analisada por cromatografia gasosa para controle de qualidade do óleo e obtenção dos percentuais dos componentes. A identificação das concentrações relativas dos componentes, foi utilizada para calcular a concentração inicial dos experimentos realizados com seus dois componentes de maior concentração (terpinen-4-ol e gama-terpineno).

Figura 1 - Planta *Melaleuca alternifolia* em seu habitat.



(A) Árvore completa. (B) Detalhe das folhas e flores.

Fonte: www.chasearomas.tk; sabaodebanho.com

Os valores ISO 4730 dos componentes do óleo e a composição obtida na análise de cromatografia estão expressos na Tabela 1. Os valores percentuais para terpinen-4-ol (Figura 2) e gama-terpineno foram, respectivamente: 47,66% e 23,58%, baseados na cromatografia realizada.

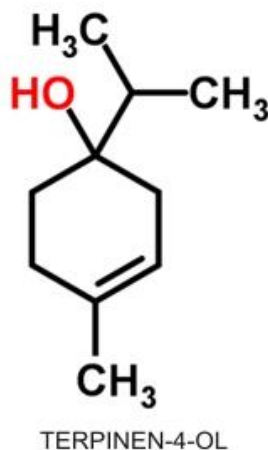
Tabela 1 - Composição do óleo de melaleuca obtido na cromatografia.

	TTO-SIGMA(%)	ISO 4730(%)	
		Mínimo	Máximo
Terpinen-4-ol	47,66	30,00	48,00
γ -Terpineno	23,58	10,00	28,00
α -Terpineno	6,45	5,00	13,00
1,8-Cineole	1,05	-	15,00
Terpinoleno	3,56	1,5	5,00
p -Cymene	2,58	0,5	8,00
α -Pinene	2,83	1,00	6,00
α -Terpineol	5,13	1,50	8,00
Limoneno	1,0	0,50	1,50

Dados obtidos na cromatografia do óleo, em comparação com os valores ISO 4730.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 2 - Estrutura química do principal componente, terpinen-4-ol.



Fonte: <http://www.oleosessenciais.org/oleo-essencial-de-tea-tree-melaleuca/>

4.2 Linhagens Celulares

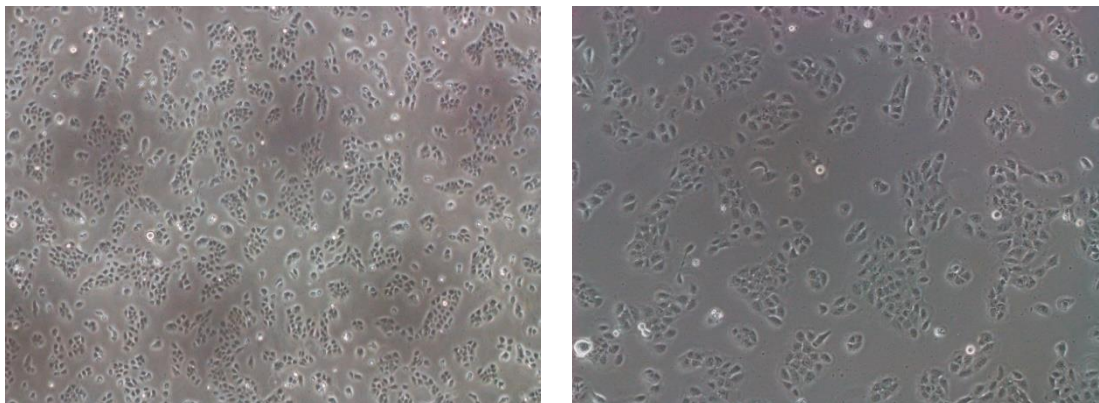
4.2.1 Carcinomas espinocelulares e ceratinócito imortalizado

Duas linhagens de carcinoma espinocelulares de cabeça e pescoço (CECs), SCC-25 (Squamous cell carcinoma) e HSC-3 (Human oral squamous cell carcinoma) e uma linhagem de célula epitelial de Linhagem Celular de Ceratinócitos humanos (Human Keratinocyte Cell line - HaCaT) foram cedidas pelo Departamento de Diagnóstico Oral, área de patologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (UNICAMP). A linhagem HaCaT foi mantida em DMEM/F10 com 10% de soro fetal bovino (SFB) e penicilina-estreptomicina 1% e congelada a -80°C com 10% de dimetilsulfóxido (DMSO). A linhagem SCC-25 foi mantida em DMEM/F12 com 10% de soro fetal bovino (SFB) e penicilina-estreptomicina 1%, 400ng de hidrocortizona por mL e congelada a -80°C com 10% de dimetilsulfóxido (DMSO). E por fim, a linhagem HSC-3 foi mantida em DMEM/F12 com 10% de SFB, penicilina-estreptomicina 1%, 400ng de hidrocortizona por mL, 0,01g de vitamina C para cada 200mL de meio e congeladas a -80°C com 10% de DMSO.

4.2.2 Fase experimental das culturas celulares (CECs e HaCaT)

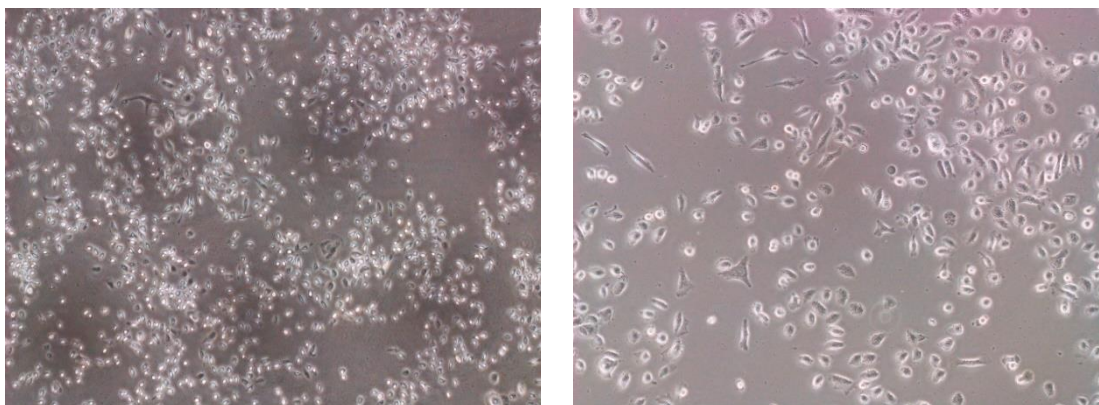
Na fase experimental, a linhagem HaCaT e as linhagens de CECs (SCC-25 e HSC3) foram descongelados em banho maria a 37°C. Após o descongelamento as células foram cultivadas rotineiramente em frascos 75-cm² com 10 mL de meio de cultura (DMEM ou DMEM+hidrocortizona e 10% de SFB, conforme a necessidade de cada linhagem celular) e mantidas a 37° C em 5% CO₂ em ambiente constantemente umidificado com substituição do meio a cada 2–3 dias (Figuras 3, 4 e 5). Os seguintes experimentos foram realizados em triplicata.

Figura 3 - Linhagem HaCaT em cultivo- nos aumentos de 5X e 10X.



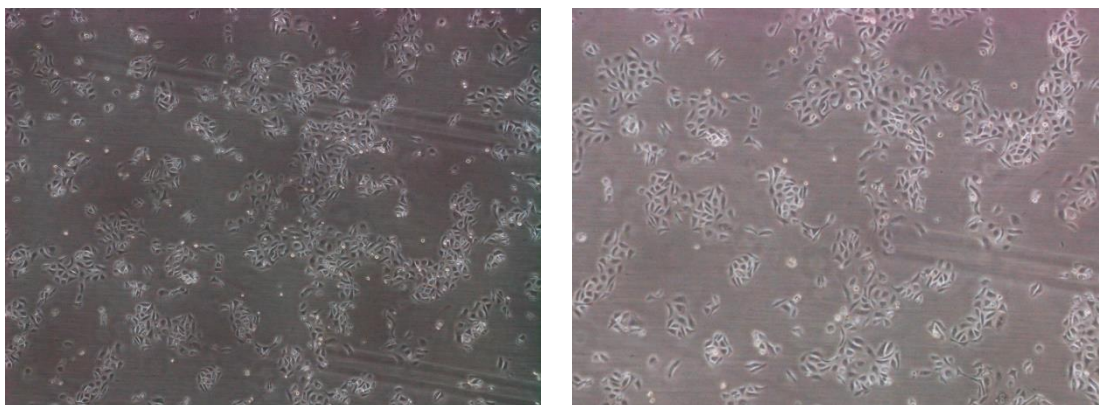
Fonte: Elaboração própria.

Figura 4 - Linhagem HSC-3 em cultivo- nos aumentos de 5X e 10X.



Fonte: Elaboração própria.

Figura 5 - Linhagem SCC-25 em cultivo- nos aumentos de 5X e 10X.



Fonte: Elaboração própria.

4.3 Avaliação da Citotoxicidade em Cultura de Células

4.3.1 Análise colorimétrica do metiltetrazolium (MTT)

A análise de MTT, baseia-se no efeito do composto/extrato sobre o metabolismo celular de glicídios por meio das desidrogenases mitocondriais. A viabilidade mitocondrial e consequentemente celular é quantificada por meio da capacidade da célula em converter o sal de MTT (amarelado e solúvel em água), em formazan (precipitado arroxeado e insolúvel em água) via desidrogenases mitocondriais ¹⁸.

As amostras de HaCaT e CECs foram avaliadas utilizando-se a análise colorimétrica do Metiltetrazolium (ensaio de MTT). Esta análise serviu de parâmetro para a produção do IC₅₀, o qual foi utilizado como concentração padrão para os experimentos subsequentes. Sendo assim, esta primeira análise contou com maior número de diluições de TTO e de suas porções solúveis. Este experimento também serviu como chancela para a inclusão das substâncias nos experimentos subsequentes, o componente que não foi possível calcular o IC₅₀, não foi incluído nos próximos experimentos. Além disso, sendo o TTO o produto de análise inicial de viabilidade, nenhum componente foi analisado em concentração maior que a encontrada no TTO (concentração relativa proporcional as testadas no TTO).

Sendo a forma de análise de MTT, uma reação química, inicialmente realizamos o teste que identifica se há possível reação direta entre os componentes (MTT e TTO). Após a mistura dos mesmos, não observamos alteração de cor, excluindo assim reação química direta entre eles.

O controle positivo usado foi a Doxorrubicina - 45µM, solubilizada em meio de cultura.

Para a preparação da solução de MTT, 25 mg do sal de metiltetrazolium foram adicionados em 5 mL de PBS, alcançando a concentração final de 5 mg/mL. Células metabolicamente ativas foram transferidas para placas de 96 poços (Ceratinócitos imortalizados e CECs) à concentração de $1,5 \times 10^5$ céls/poço em condições aderentes por períodos de 24 horas. Posteriormente, foram expostas ao TTO em concentrações decrescentes (1/2) a partir da concentração inicial de 2% (1%, 0,5%, 0,25%, 0,125%, 0,062%, 0,031%), por 24 horas, em

todos os casos, associando o diluente dimetil sulfóxido (DMSO) 0,4% para o meio de cultura. Já as principais porções solúveis utilizamos o resultado da cromatografia para calcular as concentrações relativas de cada produto e ajustar para os experimentos. No caso do terpinen-4-ol as concentrações utilizadas foram (1%, 0,5%, 0,25%, 0,125%, 0,062%, 0,031%, 0,015%), pelo mesmo tempo de exposição ao TTO, nesse caso, não foi utilizado diluente no meio de cultura por se tratar de substância hidrossolúvel.

Os controles positivos foram realizados pelo mesmo tempo de exposição ao óleo ou porções solúveis e o controle negativo foi realizado utilizando o meio de cultura e o meio de cultura com o diluente DMSO 0,4% conforme a substância em teste.

Após a exposição, o meio foi retirado e as células receberam 100 µL de meio de cultura com 0,5 mg de MTT (Sigma-Aldrich, USA) por mL, seguido de incubação por 4h a 37°C. Posteriormente a solução de MTT foi substituída por 100 µL de DMSO para a solubilização dos cristais de formazan. A absorbância foi registrada com espectrofotômetro (BIO-RAD, modelo 3550-UV, microplate reader Hercules, Califórnia, EUA) para placas com comprimento de onda 570 nm. Após esta análise os dados foram tabulados utilizando o controle negativo considerado como viabilidade 100%. Posteriormente, os resultados foram transformados para base logarítmica e o IC50 foi calculado (50% de células viáveis), identificando a concentração necessária para obter 50% de células viáveis no TTO e porções solúveis. Para tanto, utilizamos análise em programa estatístico, *Graphpad Prism*TM6.0 (La Jolla, California, USA).

4.4 Teste do Micronúcleo

Eventualmente é possível que ocorra danos ao DNA da célula que não levam a apoptose ou necrose. Esses danos causam mutações cromossômicas, que são fatores essenciais da carcinogênese ²⁴, sendo assim, consideramos importante a identificação da possível capacidade mutagênica de nossas substâncias teste em concentrações menores que as capazes de propiciar a morte celular. O teste de Micronúcleo (MN) têm emergido como um dos métodos confirmatórios para avaliar danos cromossômicos. Os MNs são expressos nas células em divisão celular e são identificados na fase binucleada, quando ocorre danos cromossômicos, fragmentos ou cromossomos inteiros que não migrem para os pólos do fuso durante a mitose. Um método especial foi desenvolvido para identificar essas células na fase binucleada, que ocorre quando há o bloqueio da citocinese pela Citocalasina-B (CIT-B). A CIT-B é um agente inibidor da polimerização da proteína actina, necessária para a formação do anel de microfilamentos que induzem a contração do citoplasma e clivagem da célula em duas células-filhas - citocinese. O emprego da CIT-B resulta em um acúmulo de células binucleadas a partir de células que passaram por apenas um ciclo de divisão. Havendo a formação de MNs, eles também ficarão contidos no citoplasma, são idênticos ao núcleo porém morfologicamente menores. Os eventos que estão relacionados com a formação do micronúcleo podem ocasionar ativação de protooncogenes ou deleção de genes supressores de tumor ou de reparo do DNA, culminando com a transformação maligna. Sua frequência representa um índice composto de aberrações cromossômicas em uma determinada população celular, tendo Schmid et al. ²² (2007), proposto em 1975 sua utilização como teste de curta duração para avaliação do potencial genotóxico de agentes químicos e físicos ⁸.

Para o teste de Micronúcleo, foram plaqueadas 4×10^3 células/poço e cultivadas em placas de 96 poços por 24 horas para a formação da monocamada confluenta. Após esse período, a placa foi tratada com TTO e porções solúveis, pelo tempo de 24 horas. O controle positivo utilizado no ensaio foi o Peróxido de Hidrogênio- 0,1 mM (CP). Foi então colocada a Citocalasina B por 36 horas na estufa a 37°C. Após esse período, a placa foi centrifugada durante 5 minutos a

4.000 rpm. O meio com Citocalasina B, foi então retirado e cada poço foi lavado com PBS 1X (400µL/poço). As células foram fixadas com etanol absoluto (100µL/poço), durante 30 minutos, em temperatura ambiente. Foram adicionados 100µl/poço de FITC (1µg/mL), durante 30 minutos em temperatura ambiente. Os poços foram lavados novamente com PBS 1X (400µL/poço) e colocado 50 µL/poço de Hoescht (10µg/mL), durante 15 minutos. As imagens foram imediatamente adquiridas e analisadas utilizando o equipamento IN Cell Analyser 2000 (GE Healthcare), nas dependências do Núcleo de Proteômica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP.

4.5 In Cell Analyzer 2000

As análises do ensaio de apoptose e de micronúcleo, foram feitas pelo aparelho IN CELL ANALYZER 2000 (Figura 6), nas dependências do Núcleo de Proteômica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara- UNESP. O aparelho apresenta câmara com temperatura e concentração de CO₂ controladas, semelhantes as necessárias para a manutenção e crescimento celular (Câmaras de CO₂ de cultivo celular). É um sistema de imagem automatizado para análises celulares em tempo real, capaz de realizar análises em modelos celulares em grande escala tanto em material fixado quanto in vivo utilizando sensores de fluorescência. Além disso, apresenta softwares com ferramentas multifuncionais que propiciam as análises dos dados obtidos.

Figura 6 - Aparelho IN CELL ANALYZER 2000.



Fonte: Elaboração própria.

4.6 Forma de Análise dos Resultados

Os resultados foram expressos na forma de ensaios de susceptibilidade, concentração de células em necrose/apoptose e grau de mutagenicidade. Foram realizadas análises com teste T e teste de qui-quadrado, comparando os resultados obtidos pelo óleo de *Melaleuca alternifolia*, porções solúveis e controles.

Os resultados de citotoxicidade, no caso o MTT, foram transformados para base logarítmica e o IC₅₀ foi calculado (50% de células viáveis). Para comparação dos resultados foi aplicado o teste de análise de variância *one-way* ANOVA, com pós teste de Tukey. Para o ensaio de Anexina-V e Micronúcleo, foi utilizada a mesma metodologia estatística que foi a aplicada no ensaio de citotoxicidade. As análises foram realizadas em programa estatístico, *Graphpad Prism*TM6.0 (La Jolla, California, USA).

As médias dos valores foram obtidas pela soma aritmética dos resultados individuais dividido pelo número de repetições. Todavia, as análises estatísticas foram realizadas com os números puros obtidos em cada experimento individual. O test t de Student foi usado com valor de $p < 0,05$ para significância (* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$).

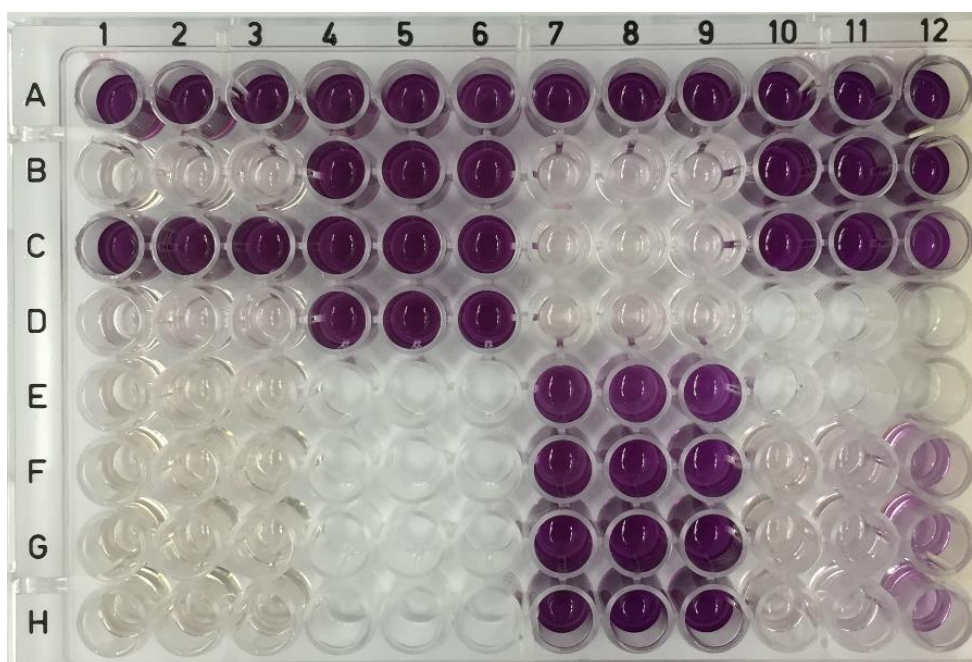
5 RESULTADO

5.1 Análise Colorimétrica do Metiltetrazolium (MTT)

Os resultados expressaram a porcentagem média de células viáveis (Figura 7). O valor da média da densidade óptica dos grupos controles foram considerados 100% de viabilidade celular para cada experimento realizado e os resultados dos demais grupos experimentais foram comparados a este valor. Após confecção dos gráficos e obtenção das equações utilizando o programa *Graphpad Prism*™ 6.0, (La Jolla, California, USA), calculou-se o valor da concentração inibitória 50% (IC₅₀), que foi utilizado para o experimento do teste de Micronúcleo.

Para os grupos com exposição ao TTO, o grupo controle foi considerado o DMEM+0,4%DMSO e para as porções solúveis, somente DMEM.

Figura 7- Tratamento com TTO e terpinen-4-ol.



Tratamento com TTO e terpinen-4-ol, mostrando perda de viabilidade nos poços brancos e grande viabilidade celular, nos arroxeados.

Fonte: Elaboração própria.

5.1.1 Resultados TTO e terpinen-4-ol

A citotoxicidade do TTO e de seu principal composto, terpinen- 4ol, foi testada em diferentes concentrações, solubilizadas em meio de cultura nas três linhagens celulares (HaCaT, HSC-3 e SCC-25), pelo tempo de tratamento de 24 horas, a fim de determinar o IC₅₀, concentração capaz de reduzir em 50% a viabilidade celular. Foi possível observar aumento da citotoxicidade, nas concentrações maiores, já nas menores as porcentagens de morte celular foram baixas, não havendo variação significativa entre elas. A análise estatística foi realizada com o teste *one-way* ANOVA com pós- teste de Tukey.

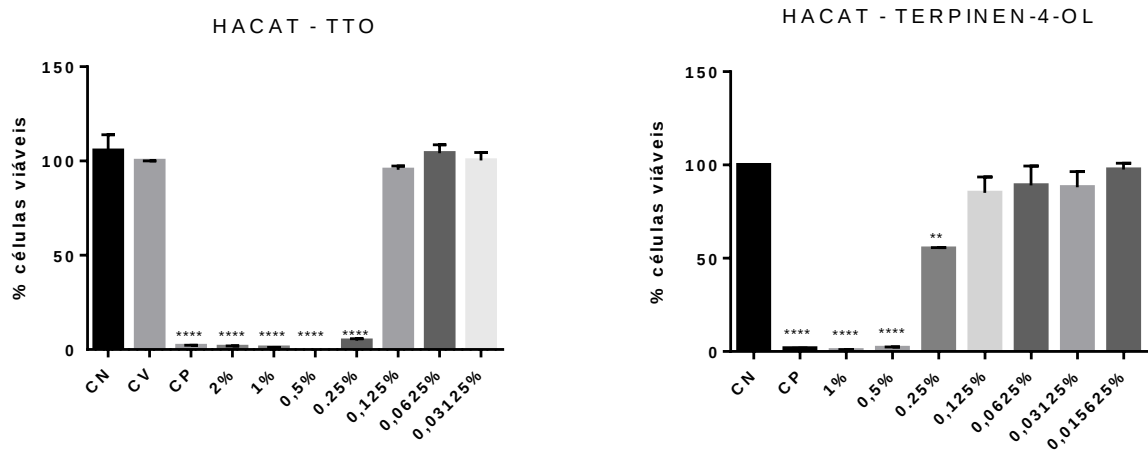
Os resultados das análises colorimétricas ao TTO e terpinen-4ol, na exposição de 24 horas, estão expressos nas Figuras 8, 9 e 10. Esses resultados demonstraram que o TTO e o terpinen-4-ol foram capazes de reduzir a viabilidade celular em todas as linhagens estudadas.

Os dados referem-se as médias de três experimentos independentes e erro padrão (M±EP). CN, controle negativo (DMEM), CV, controle de veículo (DMEM + 0,4% de DMSO), CP, controle positivo (Doxorrubicina). TTO e terpinen-4-ol foram testados em diferentes concentrações por 24 horas em cada linhagem. A análise estatística foi feita com *One-way* ANOVA com pós-teste de Tukey (Tratados vs CN/ CV). %, $p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$.

A linhagem HaCaT demonstrou redução de viabilidade celular em mais de 50 % até a concentração de 0,25%, quando exposta ao TTO (IC₅₀: 0,2) e 0,5% quando exposta ao terpinen-4-ol, (IC₅₀: 0,5). Para a linhagem maligna HSC-3, a concentração inibitória foi de aproximadamente 0,125%, quando exposta ao TTO (IC₅₀: 0,14) e 0,25% quando exposta ao terpinen-4-ol (IC₅₀: 0,3) Por fim, a linhagem SCC-25, apresentou redução de viabilidade celular em mais de 50 % até a concentração de 0,25%, quando exposta ao TTO (IC₅₀: 0,17) e 0,5% quando exposta ao terpinen-4-ol (IC₅₀: 0,45).

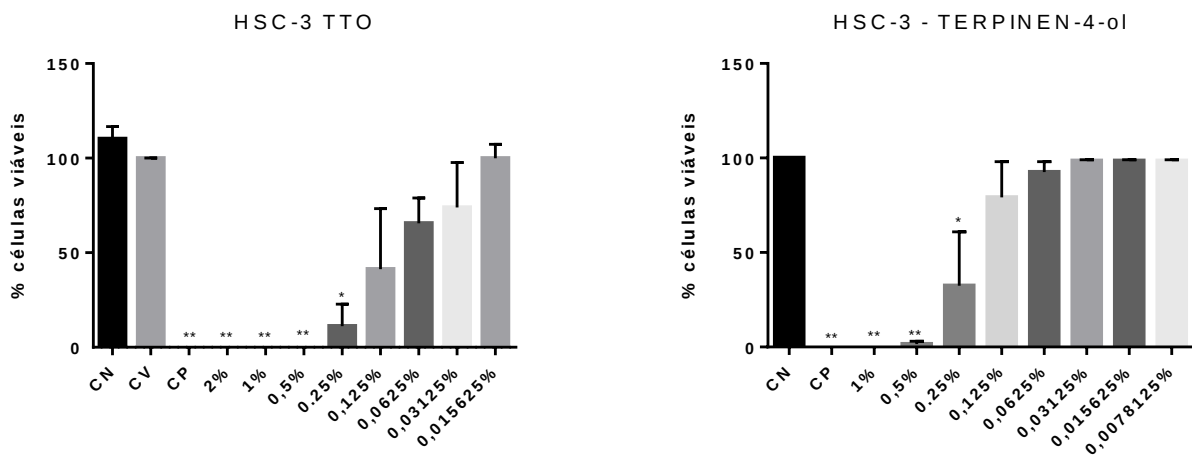
Posteriormente, os resultados foram transformados para base logarítmica e os IC₅₀ foram calculados, identificando a concentração necessária para obter 50% de células viáveis no TTO e terpinen-4ol. Para o terpinen-4ol as concentrações de IC₅₀ demonstraram-se o dobro da obtida para o TTO em todas as linhagens.

Figura 8 - Ensaio de citotoxicidade (MTT), em linhagem HaCaT

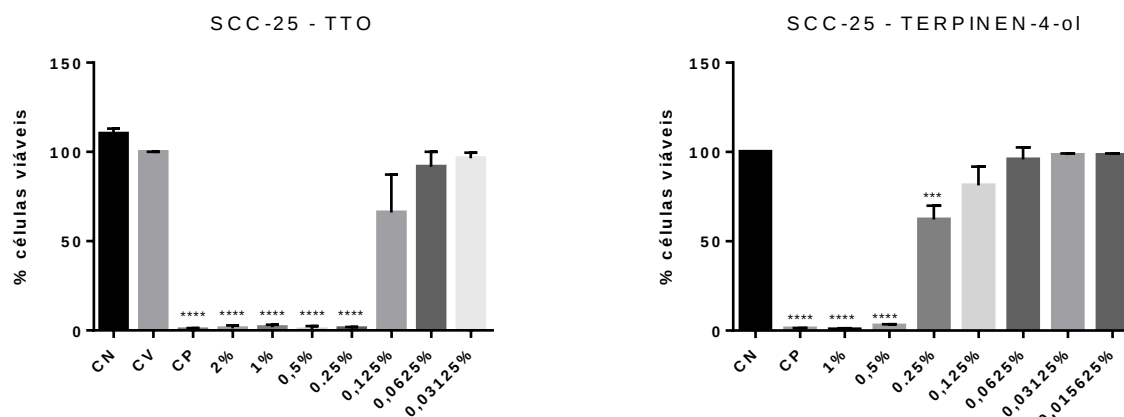


Fonte: Elaboração própria.

Figura 9 - Ensaio de citotoxicidade (MTT), em linhagem HSC-3

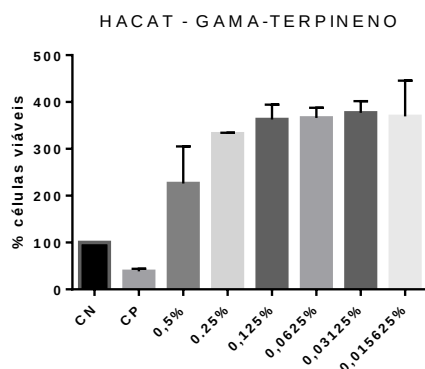


Fonte: Elaboração própria.

Figura 10 - Ensaio de citotoxicidade (MTT), em linhagem SCC-25

Fonte: Elaboração própria.

Pudemos verificar que o gama-terpineno, não foi capaz de proporcionar redução da viabilidade celular das linhagens de carcinoma oral. Para ambas as substâncias não foi possível calcular o IC₅₀. Para a linhagem HaCaT, a viabilidade celular aumentou após a exposição ao gama-terpineno (Figuras 11, 12 e 13).

**Figura 11** - Ensaio de citotoxicidade (MTT). Gama-terpineno testado em diferentes concentrações em linhagem celular HaCaT, por 2 horas de exposição.

Fonte: Elaboração própria.

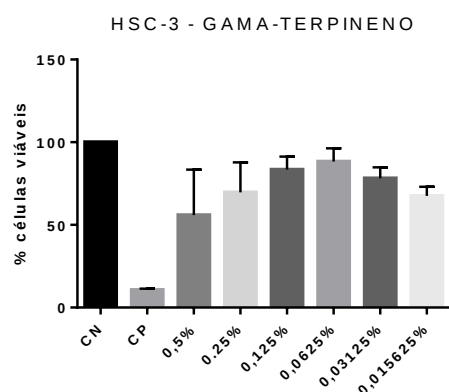


Figura 12 - Ensaio de citotoxicidade (MTT). Gama-terpineno testado em diferentes concentrações em linhagem celular HSC-3, por 2 horas de exposição.

Fonte: Elaboração própria.

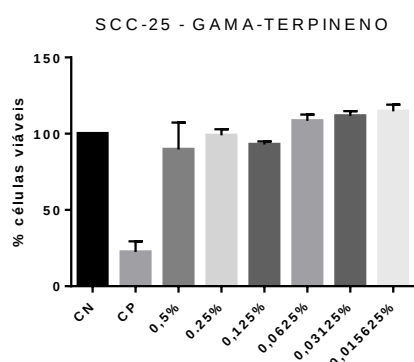


Figura 13 - Ensaio de citotoxicidade (MTT). Gama-terpineno testado em diferentes concentrações em linhagem celular SCC-25, por 2 horas de exposição.

Fonte: Elaboração própria.

5.2 Teste do Micronúcleo

Com a intenção de avaliar o possível efeito mutagênico do TTO e seu principal componente, terpinen-4-ol, foi realizado o teste do Micronúcleo. As células foram tratadas com as concentrações baseadas na análise do MTT. Foram utilizadas três concentrações abaixo do IC₅₀ de cada linhagem.

O experimento foi realizado com exposição de 24 horas, e as concentrações testadas em cada linhagem foram IC₂₀, IC₁₀, IC₀₅. Para o controle negativo dos experimentos com terpinen-4-ol, foi utilizado o DMEM (CN), já para o TTO, foi utilizado DMEM e controle de veículo DMEM+0,4%DMSO (CV). O controle positivo do ensaio foi o Peróxido de Hidrogênio- 0,1 mM (CP), com exposição de apenas 15 minutos.

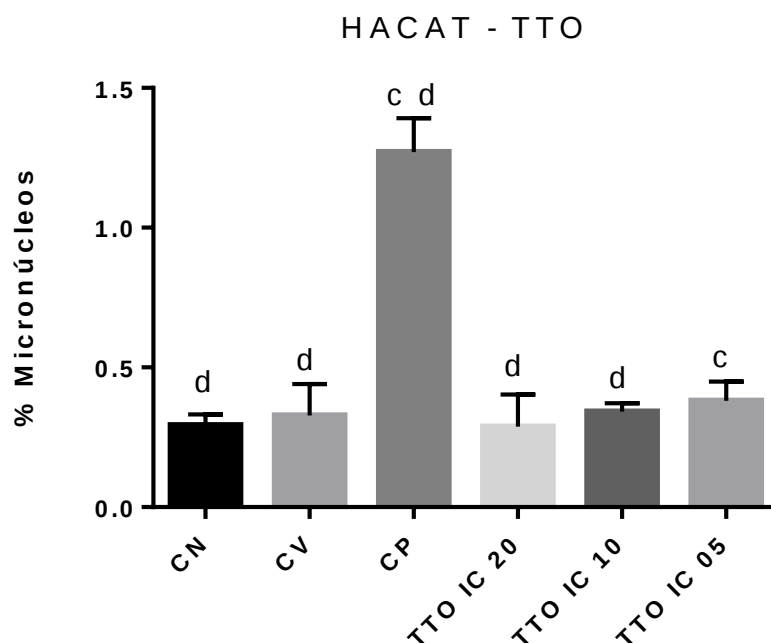
As imagens foram imediatamente adquiridas e analisadas, utilizando o equipamento IN Cell Analyser 2000 (GE Healthcare), nas dependências do Núcleo de Proteômica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP. Todos os dados do teste do Micronúcleo, referem-se às médias de três experimentos independentes ($M \pm EP$), e foram expressos através da porcentagem de micronúcleo encontrada em cada grupo testado. As análises estatísticas foram realizadas com software *Graphpad Prism*TM6.0 (La Jolla, California, e foram feitas pelo teste *One-way* ANOVA com pós- teste de Tukey). %, * $a < 0,05$, ** $b < 0,01$, *** $c < 0,001$, **** $d < 0,0001$.

5.2.1 Resultados TTO

As análises dos resultados do teste do Micronúcleo nas três linhagens testadas, após exposição ao TTO estão representados pelas Figuras 14, 15 e 16.

Para a linhagem HaCaT, observamos que o controle positivo (CP) foi diferente estatisticamente do controle de veículo (CV). Também podemos observar que não houve diferença estatística entre o CV e o controle negativo (CN). As concentrações IC₂₀, IC₁₀ e IC₀₅, foram estatisticamente diferentes do CP, porém as três concentrações testadas não apresentaram diferença estatística entre si ou contra os controles CN e CV, mostrando que as três concentrações testadas não foram mutagênicas contra a linhagem HaCaT.

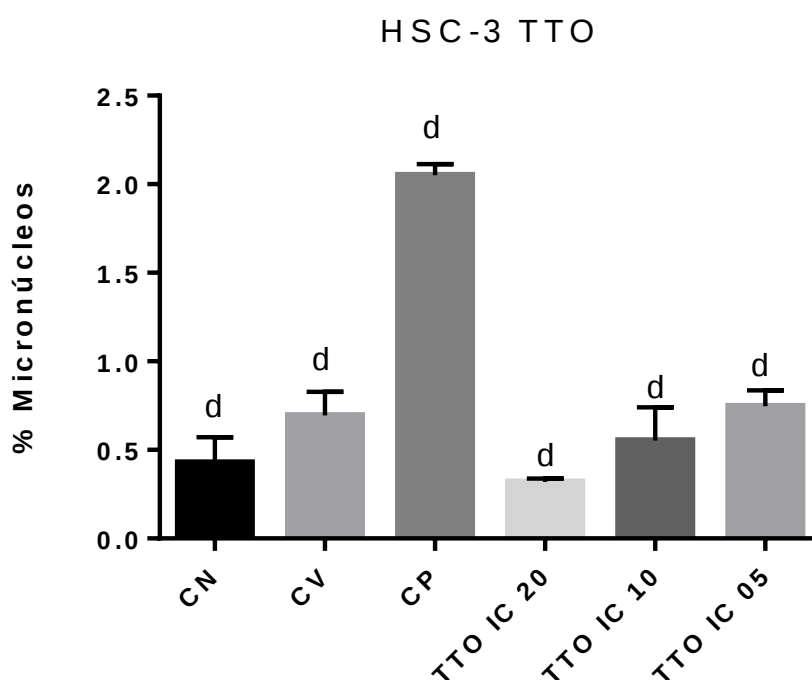
Figura 14 - Teste do Micronúcleo na linhagem HaCaT



Fonte: Elaboração própria.

Na linhagem HSC-3, foi possível ver diferença estatística entre o CP e os grupos de CN, CV, IC₂₀, IC₁₀ e IC₀₅. O CV e o CN, não apresentaram diferença entre si. As três concentrações testadas não tiveram diferença estatística com os grupos CN e CV, e foram estaticamente diferentes do grupo CP, mostrando que as concentrações não foram mutagênicas contra a linhagem HSC-3.

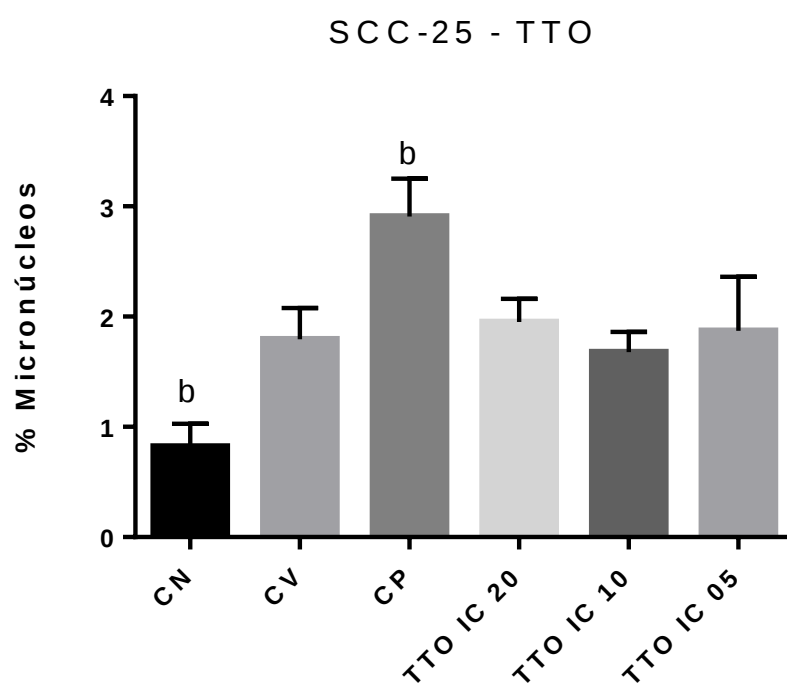
Figura 15 - Teste do Micronúcleo na linhagem HSC-3



Fonte: Elaboração própria.

A linhagem SCC-25, após exposição ao TTO, apresentou diferença estatística somente entre os grupos de CN e CP.

Figura 16 - Teste do Micronúcleo na linhagem SCC-25



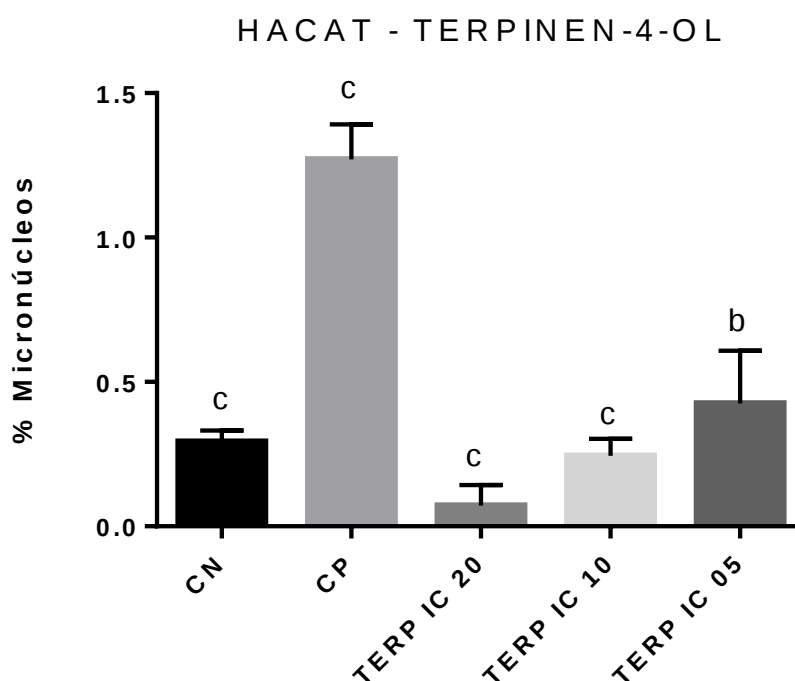
Fonte: Elaboração própria.

5.2.2 Resultados terpinen-4-ol

As análises dos resultados do teste do Micronúcleo nas três linhagens testadas, após exposição ao terpinen-4-ol, estão representados pelas Figuras 17, 18 e 19.

A linhagem HaCaT, ao ser exposta ao terpinen-4-ol, apresentou diferença estatística entre o grupo CP e o grupo CN. O grupo CP, também foi estatisticamente diferente das três concentrações testadas.

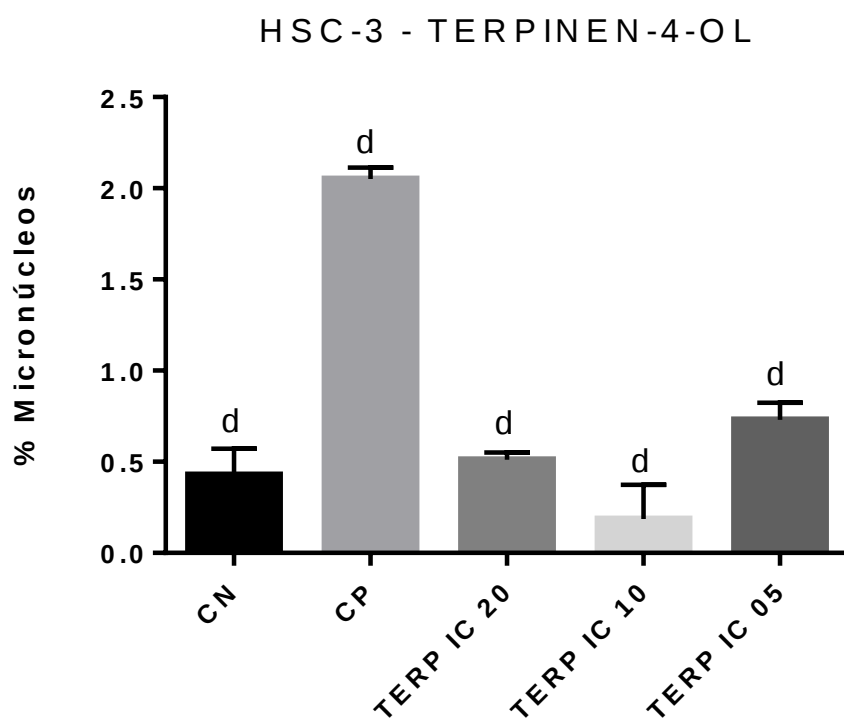
Figura 17 - Teste do Micronúcleo na linhagem HaCaT



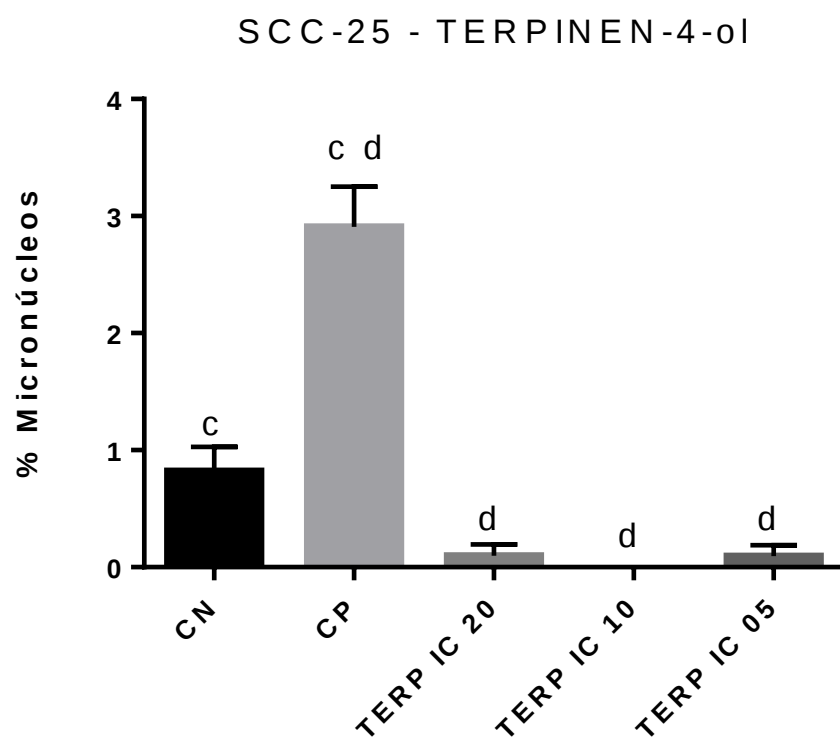
Fonte: Elaboração própria.

Para as linhagens, HSC-3 e SCC-25, ocorreram diferenças estatísticas entre o CP e o CN. Todas as concentrações testadas apresentaram diferença estatística com o CP e nenhuma diferença com o CN, mostrando que as concentrações testadas não foram mutagênicas contra a linhagem HSC-3 e SCC-25.

Figura 18 - Teste do Micronúcleo na linhagem HSC-3



Fonte: Elaboração própria.

Figura 19 - Teste do Micronúcleo na linhagem SCC-25

Fonte: Elaboração própria.

6 DISCUSSÃO

Nas últimas décadas, muito têm se falado sobre o uso de medicamentos provenientes de extratos naturais ²⁰. Com o aumento alarmante dos casos de câncer no mundo, e com as limitações dos tratamentos atuais preconizados, a busca por medicamentos de origem natural com ação antitumoral aumentaram consideravelmente.

Doll- Boscardin et al. ⁷ (2012), comprovaram em um estudo in vitro, o potencial citotóxico e antitumoral de óleos essenciais das folhas de *Eucalyptus benthamii* e alguns terpenos relacionados (alfa-terpinen, terpinen-4-ol e gama-terpineno) em três linhagens tumorais diferentes. Os resultados indicaram que o efeito citotóxico envolveu morte celular por apoptose. Além disso, houve inibição de proliferação celular devido a citotoxicidade.

Krifa et al. ¹⁶ (2015), estudaram o óleo essencial (OE) extraído da planta *Pituranthos tortuosos* e principais componentes, sabineno, alfa-pineno, limoneno e terpinen-4ol, sobre linhagens de melanoma. Os resultados comprovaram que o OE foi capaz de inibir o crescimento do tumor, associado com características apoptóticas, incluindo a condensação nuclear, sugerindo um medicamento em potencial para o tratamento de câncer.

Embora o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil - TTO) e suas porções solúveis, sejam amplamente usados por sua conhecida ação bactericida, antifúngica e anti-inflamatória, pouco se sabe sobre sua capacidade anti-tumoral. Alguns estudos foram realizados com o intuito de provar essa capacidade, porém ainda não há relatos na literatura sobre o efeito antitumoral do TTO e porções solúveis, em linhagens de células de carcinomas espinocelulares.

No presente estudo foram realizados experimentos para a avaliação da citotoxicidade, tipo de morte celular, por apoptose ou necrose, e grau de mutagênicidade, nas linhagens de carcinomas espinocelulares, HSC-3 e SCC-25, em comparação com a linhagem HaCaT, de ceratinócitos imortalizados.

O ensaio citotóxico utilizado para o nosso estudo, foi a análise colorimétrica de *Metiltetrazolium* (MTT). Com base nesse ensaio, verificamos que tanto o TTO, quanto o terpinen-4-ol foram capazes de reduzir a viabilidade em todas as linhagens. A concentração inicial usada de TTO foi de 2%, seguida de sete

diluições (1/2). Enquanto que para o terpinen-4-ol, a concentração inicial foi metade, 1%, de acordo com sua porcentagem relativa encontrada através de cromatografia gasosa.

Foi possível observar aumento da citotoxicidade nas concentrações maiores, já nas menores, as porcentagens de morte celular foram baixas, sugerindo um efeito dose-dependente, tanto para o TTO, quanto para o terpinen-4-ol.

O IC₅₀ encontrado para a linhagem HaCaT foi de 0,2%. Esse valor foi maior do que os encontrados para as linhagens de carcinomas espinocelulares, HSC-3 e SCC-25, que foram de 0,14% e 0,17%, respectivamente, sugerindo maior sensibilidade das linhagens de carcinoma. O mesmo ocorreu após a exposição ao terpinen-4-ol, onde os valores de IC₅₀, das três linhagens, dobraram, sendo de 0,5% para a HaCaT, 0,3% para a HSC-3 e 0,45% para a SCC-25. Esse fato se deu devido a porcentagem relativa de terpinen-4-ol dentro do óleo, aproximadamente 50%. A porção solúvel gama-terpineno, presente em aproximadamente 24% do TTO, não foi capaz de reduzir a viabilidade em 50% das células, portanto não foi usada nas demais análises.

Diferente das concentrações encontradas no presente estudo, Hammer et al.¹² (2006), em uma revisão de literatura sobre a citotoxicidade do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, relataram que o TTO produz efeitos tóxicos em células de monócitos humanos, em concentrações $\geq 0,004\%$ e em neutrófilos humanos $\geq 0,016\%$. Entretanto, não há dados sobre o tempo de exposição dos compostos usados no estudo.

Calcabrini et al.⁵ (2004), também relatam usar concentrações mais baixas de TTO, 0,005% a 0,03%, para a análise de MTT, em células de melanoma humano. Os autores afirmaram não haver diferença na viabilidade das células na concentração de 0,005% e que até 0,01%, não houve interferência no crescimento das linhagens de melanoma humano, testadas por eles. A partir das concentrações de 0,02% e 0,03% foi possível notar grande inibição de crescimento celular. Este estudo também não menciona o tempo de exposição das concentrações de TTO e terpinen-4-ol utilizadas.

No estudo de Greay et al.¹⁰ (2009), as concentrações testadas de TTO, terpinen-4-ol e gama-terpineno, sobre linhagens de mesotelioma e melanoma de ratos e sobre linhagem de fibroblastos, foram testadas em concentrações que

variaram de 0,01% a 0,15%, expostas a tratamentos de 24 a 72 horas. O IC₅₀ encontrado para o TTO, foi de 0,03% e 0,02% para o terpinen-4-ol, até a exposição de 48 horas. Essas concentrações foram menos eficazes contra os fibroblastos, sendo para essa linhagem o IC₅₀ de 0,08% para o TTO e 0,1% para o terpinen-4-ol, na exposição de 24 horas.

Assim como no presente estudo, os autores relatam que o gama-terpineno e outras porções solúveis não foram capaz de produzir IC₅₀. Também mencionam efeito dose-dependente do TTO e terpinen-4-ol, também mencionado nos estudos de Khaw-on e Banjerdpongchai ¹⁵ (2012) e Banjerdpongchai e Khaw-on ¹ (2013).

Os estudos anteriores indicaram que o terpinen-4-ol é o componente mais ativo do óleo de *Melaleuca alternifolia*. Isso pode ser verificado em nosso estudo, quando comprovamos que o terpinen-4-ol foi responsável por produzir metade do IC₅₀ encontrado no TTO.

Wu et al. ²⁶ (2012), testaram várias concentrações (0,02% a 0,1%) de terpinen-4-ol em duas linhagens de células humanas de câncer de pulmão, por exposição de 24 horas. O IC₅₀ obtido foi de 0,052% e 0,046%. Os autores também mencionam o efeito dose-dependente do terpinen-4-ol.

Com a finalidade de avaliar possível efeito mutagênico da exposição ao TTO e terpinen-4-ol por 24 horas, realizamos o teste de Micronúcleo. Pudemos observar que o TTO, não foi capaz de causar mutagenicidade nas linhagens HaCaT e HSC-3. O terpinen-4-ol, não causou mutagenicidade em nenhuma das linhagens testadas.

Não existem estudos sobre o efeito mutagênico do TTO e porções solúveis, em linhagens malignas, porém a revisão de literatura feita por Hammer et al.¹² (2006), mostra que o TTO e seus componentes ativos, indicaram baixo potencial de genotoxicidade em linhagens bacterianas e de mamíferos, fato que pode ser evidenciado em nosso estudo.

7 CONCLUSÃO

- TTO reduziu a viabilidade celular em até 50%, sendo possível calcular o IC_{50} , nas três linhagens em estudo. O IC_{50} encontrado para a linhagem HaCaT foi de 0,2% e os IC_{50} das linhagens de carcinomas espinocelulares, HSC-3 e SCC-25 foram de 0,14% e 0,17%, respectivamente;

- O Terpinen-4-ol foi capaz de reduzir a viabilidade celular em até 50%, obtivemos o IC_{50} , nas três linhagens em estudo. Os valores de IC_{50} , das três linhagens foram :0,5% para a HaCaT, 0,3% para a HSC-3 e 0,45% para a SCC-25. O segundo componente mais concentrado no TTO, o gama-terpineno, não demonstrou atividade citotóxica expressiva, não sendo possível calcular seu IC_{50} .

- O TTO não apresentou mutagenicidade nas linhagens HaCaT e HSC-3.

- O terpinen-4-ol, não foi capaz de produzir mutagenicidade nas três linhagens (HaCaT, HSC-3 e SCC-25).

Referencias *

- 1 Banjerdpongchai R, Khaw-on P. Terpinen-4-ol induces autophagic and apoptotic cell death in human leukemic HL-60 cells. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013; 14 (12): 7537-42.
- 2 BBC BRASIL [homepage da internet]. Dez gráficos que explicam o impacto do câncer no mundo. [citado 04/02/2016]. Disponível em: <http://www.bbc.com/portuguese>.
- 3 Bozzuto G, Colone M, Toccaceli L, Stringaro A, Molinari A. Tea tree oil might combat melanoma. *Planta Med*. 2011; 77 (1): 54-6.
- 4 Brophy JJ, Craig DC, Goldsack RJ, Fookes CJ, Leach DN, Waterman PG. Triumphalone, a diketone from the volatile oil of the leaves of *Melaleuca triumphalis*, and its spontaneous conversion into isotriumphalone. *Phytochemistry*. 2006; 67 (18): 2085-9.
- 5 Calcabrini A, Stringaro A, Toccaceli L, Meschini S, Marra M, Colone M, et al. Terpinen-4-ol, the main component of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil inhibits the in vitro growth of human melanoma cells. *J Invest Dermatol*. 2004; 122 (2): 349-60.
- 6 Cancer Today- International Agency for Research on Cancer: World Health Organization [homepage da internet]. Lion: Cancer Today- IARC- powered by Globocan 2012 [acesso em 18/08/2016]. Disponível em: <http://qco.iarc.fr/today/home>.
- 7 Doll-Boscardin PM, Sartoratto A, Maia BHLS, de Paula JP, Nakashima T, Farago PV, et al. In vitro cytotoxic potential of essential oils of *Eucalyptus benthamii* and its related terpenes on tumor cell lines. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2012; 2012: 342652. doi: 10.1155/2012/342652.
- 8 Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res*. 2000; 455 (1-2): 81-95.
- 9 Globocan 2012 - International Agency for Research on Cancer: World Health Organization [homepage da internet]; 2012. Lion: Globocan 2012- Estimated câncer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012 [acesso em 18/08/2016]. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/>.
- 10 Greay SJ, Ireland DJ, Kissick HT, Levy A, Beilharz MW, Riley TV, et al. Induction of necrosis and cell cycle arrest in murine cancer cell lines by *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and terpinen-4-ol. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2009; 65 (5): 877-88.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-marco-2015.pdf>

- 11 Greay SJ, Ireland DJ, Kissik HT, Heenan PJ, Carson CF, Riley TV, et al. Inhibition of established subcutaneous murine tumors growth with topical *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2010; 66: 1095–102.
- 12 Hammer KA, Carson CF, Riley TV, Nielsen JB. A review of the toxicity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Food Chem Toxicol*. 2006; 44 (5): 616-25.
- 13 INCA- Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de prevenção e vigilância. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil [homepage da internet]. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer; [acesso em 2016]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>.
- 14 Ireland DJ, Greay SJ, Hooper CM, Kissick HT, Fillion P, Riley TV, et al. Topically applied *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil causes direct anti-cancer cytotoxicity in subcutaneous tumour bearing mice. *J Dermatol Sci*. 2012; 67(2): 120–9.
- 15 Khaw-on P, Banjerdpongchai R. Induction of intrinsic and extrinsic apoptosis pathways in the human leukemic MOLT-4 cell line by terpinen-4-ol. *Asian Pacific J Cancer Prev*. 2012; 13: 3073-6.
- 16 Krifa M, Mekdad HL, Bentouati N, Pizzi A, Ghedira K, Hammami M, et al. Immunomodulatory and anticancer effects of *Pituranthos tortuosus* essential oil. *Tumor Biol*. 2015; 36: 5165–70.
- 17 Mondello F, De Bernardis F, Girolamo A, Cassone A, Salvatore G. In vivo activity of terpinen-4-ol, the main bioactive component of *Melaleuca alternifolia* Cheel (tea tree) oil against azole-susceptible and -resistant human pathogenic candida species. *BMC Infect Dis*. 2006; 6:158.
- 18 Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983; 65 (1-2): 55-63.
- 19 Nwizu T, Ghi MG, Cohen EE, Paccagnella A. The role of chemotherapy in locally advanced head and neck squamous cell carcinoma. *Semin Radiat Oncol*. 2012; 22 (3): 198-20.
- 20 Oliveira ACM, Fontana A, Negrini TC, Nogueira MNM, Bedran TBL, Andrade CR, et al. Emprego do óleo de *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae) na odontologia: perspectivas quanto à utilização como antimicrobiano alternativo às doenças infecciosas de origem bucal. *Rev Bras Pl Med*. 2011; 13 (4): 492-99.
- 21 Pignon JP, Bourhis J, Domenge C, Designé L. Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analyses of updated individual data. *Lancet*. 2000; 355: 949-55.

- 22 Schmid I, Uittenbogaart C, Jamieson BD. Live-cell assay for detection of apoptosis by dual-laser flow cytometry using Hoechst 33342 and 7-amino-actinomycin D. *Nat Protoc.* 2007; 2 (1): 187-90.
- 23 Shapira S, Pleban S, Kazavov D, Tirosh P, Arber N. Terpinen-4-ol: a novel and promising therapeutic agent for human gastrointestinal cancers. *PLoS One.* 2016; 11 (6): e0156540 doi: 10.1371.
- 24 Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 1988; 175 (1): 184-91.
- 25 Walton SF, McKinnon M, Pizzutto S, Dougall A, Williams E, Currie BJ. Acaricidal activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: in vitro sensitivity of *sarcoptes scabiei* var *hominis* to terpinen-4-ol. *Arch Dermatol.* 2004; 140 (5): 563-6.
- 26 Wu CS, Chen YJ, Chen JJW, Shieh JJ, Huang CH, Lin OS, et al. Terpinen-4-ol induces apoptosis in human nonsmall cell lung cancer in vitro and in vivo. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012; 2012: 818261. doi: 10.1155/2012/818261.

Não autorizo a reprodução deste trabalho até 30 de setembro de 2018.

(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 30 de setembro de 2016.

NICOLE CASALLE

