

Avaliação *in vitro* da viabilidade de células tumorais após tratamento com α -terpineol

DAIPRAI, G.¹; STOLL, S.²; BITENCOURT, S.²; GOETTERT, M.I.^{2*}

¹Acadêmica do Curso de Biomedicina do Centro Universitário UNIVATES; ²Laboratório de Cultura de Células, Programa de Pós-Graduação Mestrado em Biotecnologia, Centro Universitário UNIVATES, Av. Avelino Talini, 171; 959000-000 - Lajeado, Rio Grande do Sul, Brasil.

*E-mail: marcia.goetttert@univates.br

Resumo: Os tratamentos atuais para o câncer causam prejuízos para o indivíduo, pois além das células tumorais também atingem as demais células em crescimento, ocasionando em diversos efeitos adversos. Os produtos naturais apresentam grande potencial para o desenvolvimento de novos fármacos e com reduzidos efeitos adversos. O composto α -terpineol apresentou atividade antiproliferativa significativa após tratamento de linhagens tumorais humanas *in vitro*, sugerindo ser uma molécula bioativa candidata ou coadjuvante para a terapêutica do câncer. Para a avaliação *in vitro* da viabilidade celular de diferentes linhagens de células tumorais foi utilizado o ensaio colorimétrico MTT. Observou-se que o composto reduziu a viabilidade celular de maneira significativa em duas das cinco linhagens avaliadas, adenocarcinoma colorretal, HT-29 (75,5% $\pm$ 2,17) e adenocarcinoma de mama MCF-7 (74% $\pm$ 1,15). Nas linhagens de adenocarcinoma colorretal (Caco-2), adenocarcinoma de próstata (LNCaP) e adenocarcinoma gástrico (ACP03), a viabilidade celular não apresentou redução significativa. Estes dados são importantes para o direcionamento de estudos de possíveis biomoléculas com potencial terapêutico. Contudo, ainda são necessários estudos para avaliar o mecanismo de ação do α -terpineol e também seu uso em outras linhagens celulares.

Palavras-chave: Compostos naturais; câncer; α -terpineol; MTT

Abstract: *In vitro* evaluation of viability of tumor cells after treatment with α -terpineol. The treatments used nowadays for cancer may bring some losses to the person, because the tumoral cells they reach other cells which are growing, what might cause many different collateral effects. Natural products show big potential to the developing of new drugs with lowered collateral effects. The compound α -terpineol showed significant antiproliferative activity after the treatment of human tumoral lineages *in vitro*, what suggest it is a bioactive competitor molecule or a supporting molecule to the

therapy against cancer. To the in vitro evaluation of viability from different lineages of tumoral cells which was used to the colorimetric test MTT. From this test it could be seen that the compound reduced the cell viability significantly in two of five lineages evaluated, colorectal adenocarcinoma, HT-29 ($75,5\% \pm 2,17$) e breast adenocarcinoma MCF-7 ($74\% \pm 1,15$). In an adenocarcinoma rectal lineage (Caco-2), prostate adenocarcinoma (LNCaP) and gastric adenocarcinoma (ACP03) the cell's viability did not show significant reduce. This data is important to the targeting of bio molecular studies with therapeutic potential. However some studies are still needed to evaluate the mechanism of action from α -terpineol and also its use in other cell leneages.

Key-words: Natural Compounds; cancer, α -terpineol; MTT

INTRODUÇÃO

O câncer é um problema de saúde pública mundial, sendo que o aumento na incidência de casos está relacionado com o aumento na expectativa de vida (Fitzmaurice et al., 2015). No Brasil, a estimativa de novos casos de câncer para o ano de 2016 foi de 596.097. No estado do Rio Grande do Sul, foram estimados 58.330 novos casos de câncer para o biênio 2016/2017, sendo os principais, próstata e mama, para homens e mulheres, respectivamente (INCA, 2017).

Em geral, os principais tratamentos para o câncer são a quimioterapia, a cirurgia e a radioterapia, porém na busca por novas alternativas para o tratamento destacam-se os produtos naturais (Sawadogo, et al., 2013). Dados de Newman e Cragg (2016) apontam que cerca de 80 % dos quimioterápicos desenvolvidos nos últimos 30 anos são oriundos de produtos naturais ou de seus derivados, em especial os de origem vegetal, como exemplo, podemos citar os quimioterápicos utilizados atualmente: paclitaxel, vinblastina, vincristina, irinotecanos, entre outros.

Os produtos naturais vêm sendo aplicados para o tratamento de diversas patologias, bem como fonte inovadora de biomoléculas para o desenvolvimento ou como coadjuvantes em diversas terapias. Dentre estes, destacam-se os óleos essenciais (OE), tendo principais constituintes químicos os terpenos, como o α -terpineol, representado na Figura 1. Este terpeno vem sendo estudado devido às diversas aplicações na aromaterapia, indústrias de cosméticos e indústria alimentícia, (Russo, et al., 2015). O α -

terpineol apresenta atividade anti-inflamatória, antisséptica (Miyazawa et al., 2002) e antifúngica (Pitarokili et al., 2002).

Em um estudo realizado por Souza, et al. (2011), o α -terpineol teve atividade gastroprotetora em dois modelos de úlcera induzida por etanol e indometacina em ratos. Provavelmente, o mecanismo de atuação ocorra através de proteção gástrica, envolvendo redução do fluxo sanguíneo e alterações na produção de secreção gástrica.

Ainda, esse terpeno apresenta atividade antiproliferativa em linhagens como K-562 (leucemia mielóide crônica), (Lampronti, 2006), NCI-H460 (adenocarcinoma de pulmão) e PC-3 (adenocarcinoma próstata), (Bicas et al., 2011). Seu mecanismo de ação ainda não está esclarecido, porém estudos sugerem que o α -terpineol atue inibindo o crescimento de células tumorais, através da inibição da via NF- κ B, (Hassan, et al., 2010). Diversos tipos de câncer expressam essa via de forma expressiva, sendo que sua inibição reflete no bloqueio da proliferação celular e consequente apoptose. Portanto, inibidores da via NF- κ B podem ser úteis como agentes anticancerígenos, (Garg e Aggarwal, 2002); (Umezawa, 2006).

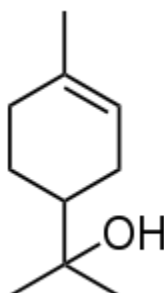


FIGURA 1. Estrutura química do α -terpineol.

Diante da necessidade de novas moléculas com potencial terapêutico para o tratamento de diferentes doenças, aliado ao potencial antitumoral de diferentes derivados de óleos essenciais, o presente estudo teve como objetivo avaliar a viabilidade de linhagens tumorais humanas após tratamento com α -terpineol.

MATERIAIS E MÉTODOS

α -terpineol

O α -terpineol foi adquirido comercialmente (Sigma Aldrich®).

Linhagens celulares

Foram utilizadas linhagens humanas de adenocarcinoma de próstata (LNCaP), adenocarcinoma colorretal (Caco-2 e HT-29), adenocarcinoma de mama (MCF-7), e adenocarcinoma gástrico (ACP03). As linhagens foram cultivadas em meio DMEM Low-Glucose (HT-29, Caco-2, MCF-7) e RPMI 1640 (LNCaP e ACP03) suplementadas com 10 % de soro fetal bovino (SFB) a 37 °C em estufa com atmosfera de 5 % de CO₂.

Viabilidade celular por MTT

O teste por MTT é um ensaio colorimétrico que avalia a atividade metabólica da célula. O princípio do método consiste na absorção do sal MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]} (Sigma®) pelas células, sendo este reduzido à formazana, através de enzimas mitocondriais (Mosmann, 1983).

Para o experimento, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços na densidade de 2×10^3 células/poço (ACP03, HT-29), 3×10^3 células/poço (MCF-7, LNCaP), 4×10^4 células/poço (Caco-2) e incubadas por 24 h (5 h no caso da ACP-03). Após, as células foram tratadas com α -terpineol na concentração de 200 μ M por 48 h. Em seguida, o tratamento foi removido e adicionado 200 μ L do corante MTT (5 mg/mL) dissolvido em meio, incubado por 3 h. As absorbâncias das amostras foram mensuradas por espectrometria em leitor de ELISA (SpectraMax) a 570 nm. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas independentes.

O percentual de viabilidade celular foi calculado utilizando a equação:

$$\text{Viabilidade} = 100 \times \text{AA/AC}$$

AA = absorbância da amostra;

AC = absorbância do controle;

Análise morfológica

A análise morfológica das células foi observada microscopicamente utilizando um microscópio invertido de contraste de fase (Labomed), com uma ampliação de 20x. Foram capturadas imagens antes e depois do tratamento.

Análise estatística

Os dados foram analisados através do método estatístico Análise de Variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo pós-teste Tukey. Os resultados foram expressos como média $\pm$ EPM. As análises estatísticas foram realizadas através do programa GraphPad Prism 5, sendo adotado o nível de significância de $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

O α -Terpineol é um álcool monoterpenoide (Figura 1) relativamente não tóxico que está presente nos óleos essenciais de várias espécies, e vem sendo estudado para fins terapêuticos como agente antitumoral natural, (Dagn e Birsat, 2000). Alguns estudos já demonstraram sua atividade antitumoral e interferência sobre a viabilidade de diferentes células tumorais como MCF-7, embora seu mecanismo de ação não esteja completamente estabelecido, (Bicas, et al., 2011). No presente estudo, frente às cinco linhagens avaliadas, somente duas apresentaram diminuição significativa na viabilidade celular, conforme Figura 2, sendo HT-29 ($75,5\% \pm 2,17$) e MCF-7 ($74\% \pm 1,15$).

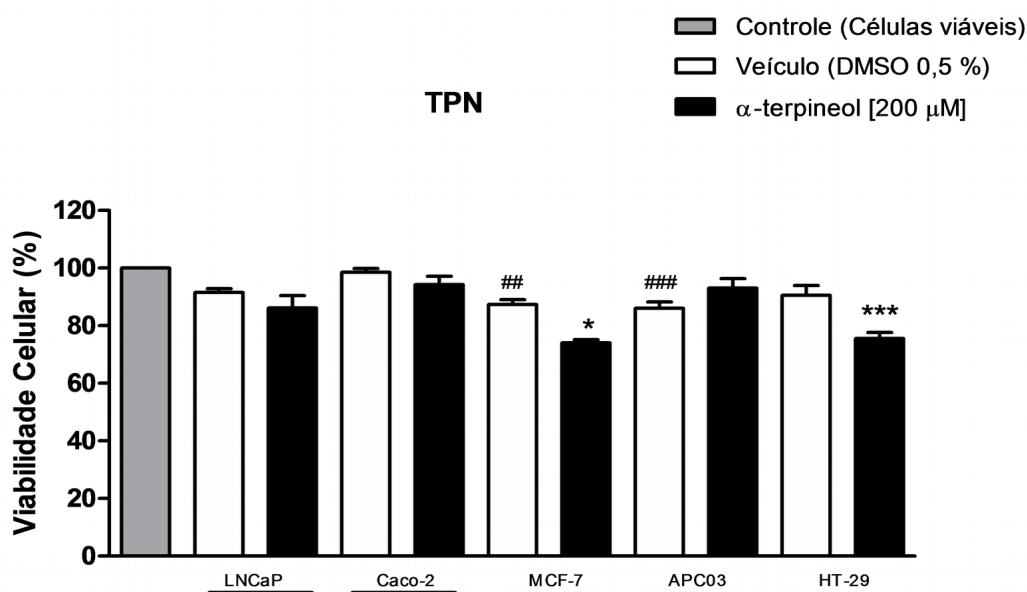


Figura 2. Viabilidade de células após 48 horas de tratamento com α -terpineol (TPN) e avaliadas pelo método de MTT. Dados apresentados como média $\pm$ EPM (n=3). * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ comparado ao veículo; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ comparado ao controle. ANOVA seguido de Tukey (n=3).

Até o momento são poucas as análises realizadas com o α -terpineol, sendo que os resultados com as linhagens estudadas nesta pesquisa são os primeiros relatos utilizando o método MTT. O ensaio de MTT foi demonstrado no estudo de Hussain et al.(2011), onde o autor compara o efeito de óleos essenciais presentes em *Origanum vulgare* (α -terpineol: 8,57%) e *Origanum majorana* (α -terpineol: 8,57%), sob células LNCaP e MCF-7. *Origanum majorana* a 0,5 mg/mL, demonstrou ter maior atividade no ensaio de citotoxicidade para LNCaP ($85,3 \pm 2,8$) e para MCF-7 ($70,0 \pm 2,5$), o que corrobora com os resultados. No presente estudo para as células LNCaP, manteve-se uma média de ($86,6 \pm 4,28$) e para MCF-7, ($74 \pm 1,15$), respectivamente.

Ainda são necessários estudos para compreender o mecanismo de ação do α -terpineol frente às células tumorais. Até o momento a inibição da via NF-kB parece estar relacionada com o potencial antiproliferativo, o qual é indutor de citocinas inflamatórias como IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 e TNF- α , (Umezawa, 2006); (Hassan, et al., 2010); (Nogueira, et al., 2014). O α -terpineol reduz a produção de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e óxido nítrico (NO) em modelo animal, (Oliveira, et al., 2012), sendo que o TNF- α é uma potente citocina pró-inflamatória que desempenha importante papel na modulação da inflamação, e consequentemente interferindo no ambiente tumoral (Hanahan e Weinberg, 2011). Além disso, o α -terpineol apresentou inibição seletiva da atividade da COX-2 em modelo animal (Kahlil, et al., 2004; Kawata, et al., 2008).

Através de imagens realizadas para acompanhar o efeito do composto sobre a proliferação das células, e para a observação morfológica das mesmas, foi possível identificar uma redução da população celular da HT-29 e MCF-7 (Figura 3), em comparação às células controle.

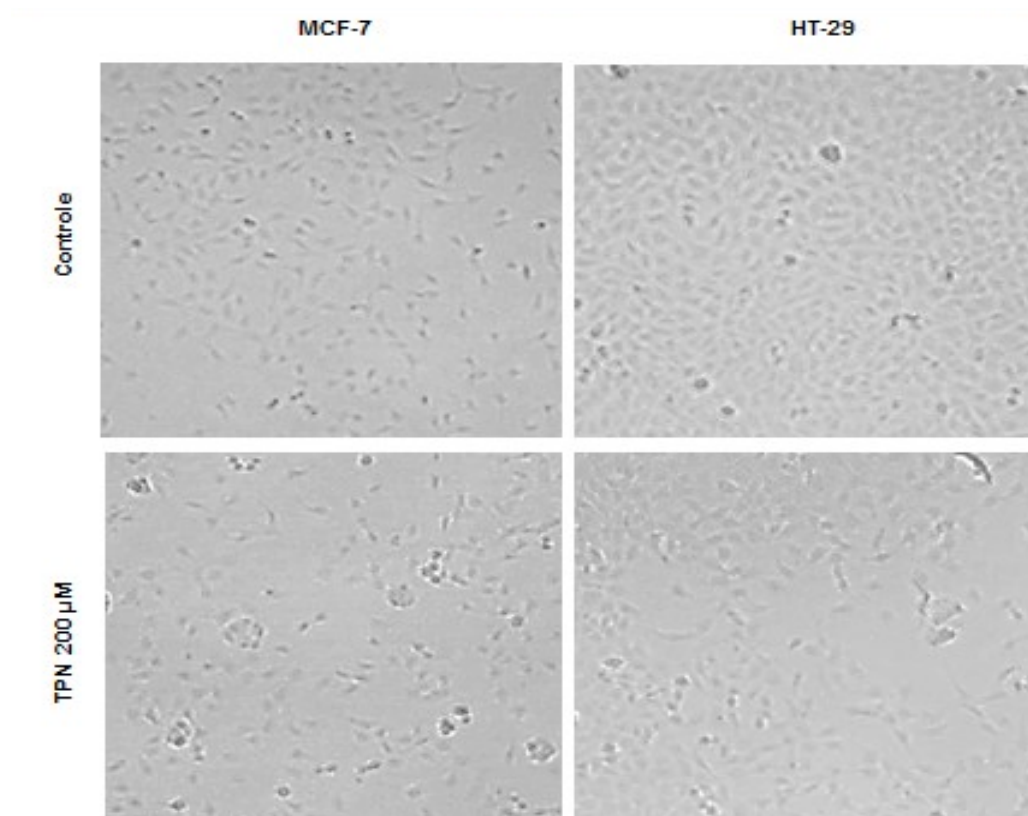


FIGURA 3: Linhagens celulares após tratamento com 200 µM de TPN por 48 h. Imagens capturadas por microscópio invertido com aumento de 20 X.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, o α -terpineol apresentou redução significativa frente à viabilidade celular de duas linhagens, MCF-7 e HT-29. Estes dados são importantes para o direcionamento de estudos de possíveis biomoléculas com potencial terapêutico, sugerindo ser uma molécula candidata ou coadjuvante para a terapêutica do câncer. Contudo, ainda são necessários estudos para avaliar o mecanismo de ação do α -terpineol e demais potenciais aplicações.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao programa de pós-graduação em Biotecnologia, ao projeto de pesquisa “Biotecnologia e farmacologia de produtos naturais”, do Centro Universitário UNIVATES.

Referências

BICAS, J. L. et al. Evaluation of the antioxidant and antiproliferative potential of bioflavors. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 7, p. 1610-1615, 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21540069>>. Acesso em: 03 de março de 2017.

BRASIL. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva - INCA. **Estimativa 2016**: Incidência de Câncer no Brasil, Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/index.asp>>. Acesso em: 20 maio de 2017.

DAGNE, E. Bisrat, D.; ALEMAYEHU, M.; Worku, T. Essential oils of twelve eucalyptus species from Ethiopia. **J. Essent. Oil Res**, v. 12, p. 467–470, 2000. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10412905.2000.9699567>>. Acessado em: 22 de abril de 2017.

FITZMAURICE, Christina et al. The global burden of cancer 2013. **JAMA oncology**, v. 1, n. 4, p. 505-527, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26181261>>. Acesso em 20 maio de 2017.

GARG, A.; AGGARWAL, B. B. Nuclear transcription factor-[kappa] B as a target for cancer drug development. **Leukemia**, v. 16, n. 6, p. 1053, 2002. Disponível em: < <http://search.proquest.com/openview/9db5fc9bc722c136e69d620247cb98ae/1?pq-origsite=gscholar&cbl=30521>>. Acesso em: 22 de maio de 2017.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of cancer: the next generation. **cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376230>>. Acesso em: 10 de abr de 2017.

HASSAN, Saadia Bashir et al. Alpha terpineol: a potential anticancer agent which acts through suppressing NF- κ B signalling. **Anticancer Research**, v. 30, n. 6, p. 1911-1919, 2010. Disponível em: < <http://ar.iiarjournals.org/content/30/6/1911.short>>. Acesso em: 12 maio de 2017.

HUSSAIN, Abdullah I. et al. Composition, antioxidant and chemotherapeutic properties of the essential oils from two *Origanum* species growing in Pakistan. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 6, p. 943-952, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2011000600003>. Acesso em: 10 jan. 2017.

KHALIL, Zeinab et al. Regulation of wheal and flare by tea tree oil: complementary human and rodent studies. **Journal of investigative dermatology**, v. 123, n. 4, p. 683-690, 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022202X1530988X>>. Acesso em: 20 de maio de 2017.

KAWATA, J.; KAMEDA, M.; MIYAZAWA, M. Cyclooxygenase-2 inhibitory effects of monoterpenoids with a p-methane skeleton. **Int. J. Essent. Oil Ther**, v. 2, p. 145–148, 2008. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/288567821_Cyclooxygenase-2_inhibitory_effects_of_monoterpenoids_with_a_p-methane_skeleton>. Acessado em: 15 de maio de 2017.

LAMPRONTI, Ilaria; SAAB, Antoine M.; GAMBARI, Roberto. Antiproliferative activity of essential oils derived from plants belonging to the Magnoliophyta division. **International journal of oncology**, v. 29, n. 4, p. 989-996, 2006. Disponível em: <<https://scholar.google.com.br/scholar?hl=pt-BR&q=Antiproliferative+activity+of+essential+oils+derived+from+plants+belonging+to+the+Magnoliophyta+division&btnG=&lr=>>>. Acesso em: 03 de março de 2017.

MIYAZAWA, Mitsuo; OHSAWA, Masashi. Biotransformation of α -terpineol by the larvae of common cutworm (*Spodoptera litura*). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 50, n. 17, p. 4916-4918, 2002. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf020287e>>. Acesso em: 01 de junho de 2017.

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **J. Nat. Prod.**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016. Disponível em: < <http://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acs.jnatprod.5b01055?src=recsys>>. Acesso em: 22 de maio de 2017.

NOGUEIRA, M. N. M. et al. Terpinen-4-ol and alpha-terpineol (tea tree oil components) inhibit the production of IL-1 β , IL-6 and IL-10 on human macrophages. **Inflammation Research**, v. 63, n. 9, p. 769-778, 2014. Disponível em:< <https://link.springer.com/article/10.1007/s00011-014-0749-x>>. Acesso em: 20 março de 2017.

OLIVEIRA, Makson GB et al. α -Terpineol reduces mechanical hypernociception and inflammatory response. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 111, n. 2, p. 120-125, 2012. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1742-7843.2012.00875.x/epdf>>. Acesso em: 06 de maio de 2017.

PITAROKILI, D.; COULADIS, M.; PANAYOTAROU, N. P.; TZAKOU, O.; J. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p. 6688. 2002.

RUSSO, Rossella et al. Exploitation of cytotoxicity of some essential oils for translation in cancer therapy. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015. Disponível em: < <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2015/397821/abs/>>. Acesso em: 27 março de 2017.

SAWADOGO, Wamtinga Richard et al. A survey of marine natural compounds and their derivatives with anti-cancer activity reported in 2011. **Molecules**, v. 18, n. 4, p. 3641-3673, 2013. Disponível em: < <http://www.mdpi.com/1420-3049/18/4/3641/htm>>. Acesso em: 14 de fev. 2017.

SOUZA, R. H. L. et al. Gastroprotective activity of α -terpineol in two experimental models of gastric ulcer in rats. **Daru**, v. 19, n. 4, p. 277-281, 2011. Disponível em: < http://www.sid.ir/en/VEWSSID/J_pdf/85820110405.pdf>. Acesso em: 17 maio d 2017.

UMEZAWA, Kazuo. Inhibition of tumor growth by NF- κ B inhibitors. **Cancer science**, v. 97, n. 10, p. 990-995, 2006. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1349-7006.2006.00285.x/full>>. Acesso em: 04 de março de 2017.