

ARTIGO DE OPINIÃO / REVISÃO INSTITUTO DE OSMOLOGIA E ÓLEOS ESSENCIAIS - IOOE - PRODUZINDO REFERÊNCIAS CIENTÍFICAS

Autor: Professor Doutor Carlos Jorge Rocha Oliveira
Biólogo CRBio 19428/01D

Recebido em: set. 2018; aceito set. 2018; publicado out. 2018.

Em últimas comunicações científicas publicadas por integrantes do corpo científico do **iooe**, em diferentes periódicos, observamos o avanço biológico de suas pesquisas. Visando desenvolver a partir de insumos naturais, conhecimento aplicável ao bem-estar da sociedade, o **iooe** tem intensificado suas linhas de pesquisas baseadas na biologia molecular com o objetivo de esclarecer os verdadeiros efeitos celulares dos óleos essenciais. Neste artigo farei um breve resumo de estudos já consolidados cientificamente e a participação do **iooe** em suas referências.

1. Trabalhos científicos de ciências com base molecular, demonstram que vias de sinalização celular são alvos de estudos pertinentes na busca do entendimento de estímulos que ativem o mecanismo celular, quer seja na manutenção, proliferação e morte celular (apoptose).

Em estudos, Oliveira, CJR, et. al, 2003, apontam seus resultados para uma integração das diferentes vias de sinalização mediadas por Óxido Nítrico (NO):

Primeiro - NO e cGMP ao estimularem a atividade tirosina do receptor de EGF devem agir em combinação para ativar p21Ras. **Segundo** - NO/cGMP ao ativarem p21Ras tem seus efeitos mediados por Raf-1, MEK 1 e as MAP quinases ERK 1 e ERK 2. **Terceiro** - a ativação de ERK 1 e ERK 2 precede e é responsável pela ativação do receptor de EGF, cuja atividade tirosina quinase deve iniciar a cascata de fosforilação em tirosina de várias

proteínas em células endoteliais de aorta de coelho estimuladas pelo radical livre”. A representação esquemática da possível integração entre estas vias de sinalização mediadas pelo NO está mostrada na Figura 1.

Estes achados sugerem a participação do NO na angiogênese, processo que envolve a proliferação e a migração de células endoteliais. Levando em conta essas observações, a presente cascata de sinalização mediada pelo NO, pode esclarecer o mecanismo que marca a participação deste radical na proliferação de células endoteliais, como foi demonstrado através das curvas de crescimento celular^[1].

Ainda nessa linha de pesquisa, Oliveira, C.J.R, et.al, 2008, publica mais evidências da participação do Óxido Nítrico (NO) na proliferação celular através da ativação do ciclo celular.

Resultados demonstram inequivocamente a participação do NO na progressão do ciclo celular em células endoteliais de aorta de coelho. Seus efeitos são exercidos especificamente sobre a via p21Ras – MAP quinase. A sequência de eventos: fosforilação de Elk-1, síntese de ciclina D1, cdk4, cdk6, fosforilação da pRb, transição do ciclo celular da fase G1 para a fase S, controlada pela ciclina E, passagem da fase S para G2/M através do aumento da expressão da ciclina A que culmina com a proliferação das células. A representação esquemática desta via de sinalização mediada pelo NO está proposta na figura 2.^[2]

Figura 1.

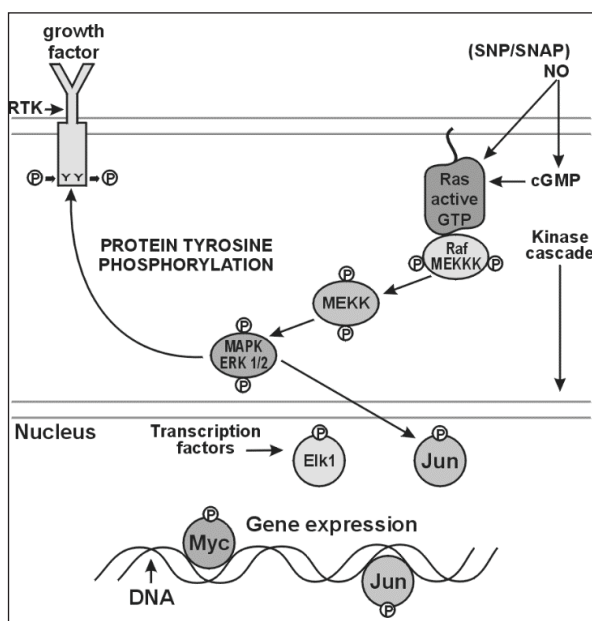


Figura 1. Esquema proposto para a via de transdução de sinal mediada por NO. Elaborado por Juliano Rocha, designer gráfico,^[1].

Figura 2.

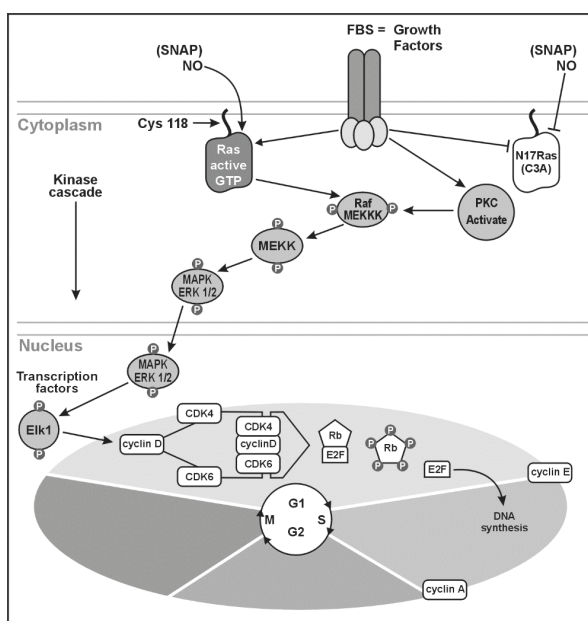


Figura 2. Representação esquemática da via de sinalização mediada pelo óxido nítrico (NO) em células endoteliais de aorta de coelho. NO atua a via p21Ras, Raf-1, MEK 1 e as MAP quinases ERK 1 e ERK 2. NO regula o curso do ciclo

celular através do ponto de restrição da fase G1/S por indução da síntese de ciclinas D1 / cdk 4, cdk6. A hiperfosforilação da proteína Rb marca o ponto de restrição no qual a célula libera o fator de transcrição E2F que regula o gene da ciclina E, dando início a síntese do DNA. O aumento de expressão da ciclina A caracteriza a passagem do ciclo celular da fase S para a fase G2/M, via rotas de sinalização Ras/Raf/MAP quinase ERK 1 e 2 mediadas pelo NO. Na ausência de p21Ras funcional (N17Ras, C3A), NO não promove a ativação da via Ras-MAP quinase e a progressão do ciclo celular. Fatores de crescimento podem participar deste evento independentemente de p21 Ras. Elaborado por Juliano Rocha, designer gráfico,^[2].

2. Em 2017 o iooe participa de uma publicação onde ácido hialurônico de baixo peso molecular (AH) é proposto como agente que atua nas três fases da reparação tecidual.

“O objetivo deste trabalho foi avaliar se o AH é capaz de induzir proliferação celular de fibroblastos dérmicos humanos. Esses efeitos foram avaliados empregando-se as técnicas de azul de tripano e de brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium] (MTT), seguida de análise do ciclo celular, produção de colágeno e modelo de wound healing (WH). Após tratamento com AH, foi verificado aumento significativo na proliferação das células e nas fases S-G2-M do ciclo celular, figura 1. Quando submetido ao teste de WH, a exposição a 0,2% de AH promoveu redução significativa da área da lesão, com taxas de migração celular de 74%. Os resultados confirmam a capacidade do AH em aumentar a proliferação de fibroblastos, o que é relevante para a fase proliferativa da cicatrização^[3]”.

3. Em continuidade, participa em 2018: “Avaliação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais associados a ácido hialurônico de baixo peso molecular^[4]. Cinnamomum cassia (canela), Ocimum basilicum (manjeriço), Thymus vulgaris (tomilho) e Melaleuca alternifolia (tea tree) são espécies conhecidas pela produção de óleos essenciais amplamente difundidos e utilizados em diversas

categorias de produtos, graças às variadas ações que apresentam. Uma delas é a capacidade antimicrobiana comprovada sobre vários microrganismos patogênicos, o que é objeto de interesse no contexto

do tratamento de feridas, Tabela 1. Outro componente igualmente relevante nesses casos é o ácido hialurônico (AH), dotado de propriedades antioxidantes e promotoras da regeneração celular [4].

Figura 1.

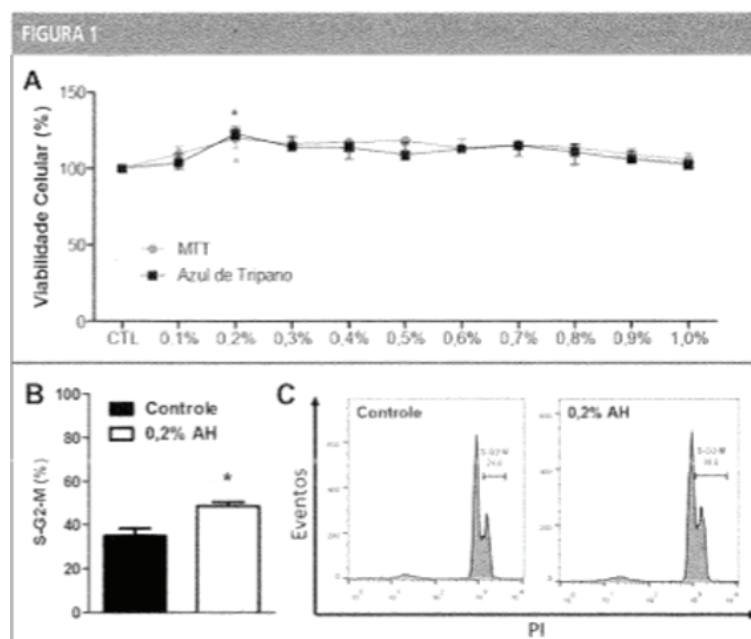


Figura 1. (A) Percentual de viabilidade celular após 24 horas de exposição a diferentes concentrações de AH de baixo peso molecular através das técnicas de azul de tripano e MTT. (*) $P < 0,05$ – significativo em relação ao controle, ANOVA, Tukey. (B) Percentual de células em fase S-G2-M obtidos após exposição por 24 horas a 0,2% de AH de baixo peso molecular sobre linhagem de fibroblastos. (*) $P < 0,05$ significativo em relação ao controle. Teste t de Student. (C) Histogramas representativos da população em fases S-G2-M do ciclo celular dos grupos controle e tratado com 0,2% de AH respectivamente. Ensaio realizado em triplicata. GraphPad Prism V.5.0. Flowjo v10.0 [3].

Tabela 1.

Tabela 1. Sensibilidade de cepas bacterianas frente à ação dos OEs, associados ou não ao AH, em comparação ao controle (estreptomicina/penicilina). Valores das médias dos diâmetros dos halos de inibição obtidos na técnica de difusão em ágar Mueller-Hinton.

INÓCULO	ÓLEO ESSENCIAL	ÓLEO ESSENCIAL+ AH	CONTROLE*
Cinnamomum cassia			
<i>Escherichia coli</i>	0,7 cm	0,7 cm	0,5 cm
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,9 cm	0,9 cm	0,8 cm
Thymus vulgaris			
<i>Escherichia coli</i>	0,5 cm	0,6 cm	0,5 cm
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,6 cm	0,6 cm	0,7 cm
Melaleuca alternifolia			
<i>Escherichia coli</i>	0,5 cm	0,4 cm	0,6 cm
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,5 cm	0,5 cm	0,6 cm

*Estreptomicina 2,5%, penicilina 2,5%. **O óleo de *Ocimum basilicum* (manjeriça) não apresentou efeito antimicrobiano. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os halos de inibição apresentados pelas dispersões de OE isolado e associado ao AH.

4. Com a publicação: "In Vitro Effects of the Phytocomplex TrichoTech™ on Human Fibroblasts: Proliferative Potential and Effects on Gene Expression of FGF-7 and FGF-10" [5], o iioe vem consolidando sua visão da importância dos estudos científicos com base nos efeitos celulares dos óleos essenciais. Neste trabalho o objetivo foi investigar o potencial proliferativo do composto TrichoTech™, um fito complexo obtido a partir de uma mistura de óleos essenciais, em cultura de fibroblastos humanos e sua capacidade de modular a expressão gênica de FGF-7 e FGF-10. O Trichotech™ mostrou aumentar a proliferação de fibroblastos em concentrações de 0,5% a 2,0% e também aumentar a porcentagem de células nas fases S / G2 / M do ciclo celular, figura 2. O Trichotech™ a ambos os 1,0% e 2,0% induziu um efeito estatisticamente significativo no ensaio de cicatrização de feridas em comparação com o controle não tratado. Nós examinamos a interação entre a sobrevivência celular (PI3K / Akt) e mitogênico (Ras / MAPK) vias de transdução de sinal após o

tratamento Trichotech™ (1,0% e 2,0%) na linhagem celular de fibroblastos. O Tricotech™ causou fosforilação de ERK1 / 2, bem como maior fosforilação de MEK em comparação com o controle não tratado e o ERK1 / 2. PI3K e AKT, no entanto, não se mostraram significativamente mais fosforilados após a exposição ao Trichotech™. Para verificar a expressão relativa de mRNA para os genes FGF-7 e FGF-10, foi utilizado um protocolo de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR). Os resultados mostram o aumento da expressão de mRNA por fibroblastos após tratamento com Trichotech™. Em ambas as concentrações testadas, o Trichotech™ aumentou a expressão de FGF-7 e FGF-10. A coloração com Sirius red permite uma avaliação rápida do conteúdo de colágeno, mostrando um aumento significativo no conteúdo de colágeno nos fibroblastos tratados. Outras investigações sobre o Trichotech™ podem ser úteis para o desenvolvimento de novos fitos complexos bioativos para uso dermatológico e tricológico [5].

Figura 2.

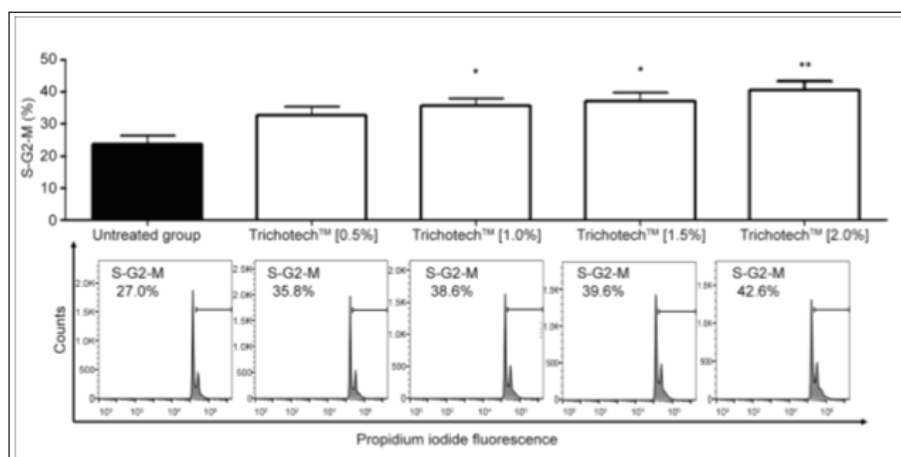


Figura 2. (a) Porcentagem de células obtidas na fase S/G2/M após exposição por 24 horas de CCD-1072 Sk em diferentes concentrações do Tricotech™. Antes de iniciar os testes, as células foram privadas de soro fetal bovino. (*) $P < 0,05$ – significativo em relação ao controle. ANOVA, Tukey. GrapPad v5.0. (b) Histograma representado estatisticamente significativo com concentração de (10%). Flowjo v.10.0, [5].

5. Pinetonina™, publicação do iioe em setembro de 2018, apresenta uma preparação de óleo essencial, administrado por via intranasal, com eficaz diminuição dos níveis de cortisol e na modu-

lação da liberação do glutamato. O iioe através de seus pesquisadores, sugerem que este fitocomplexo tem como objetivo auxiliar nos sintomas de estresse, ansiedade e distúrbios do sono [6].

Em entendimento a este estudo, precisamos relembrar um pouco sobre as formas de sinalização célula-célula, uma vez que ação da produção de hormônios que causam os sintomas de estresse e ansiedade estão intimamente ligados por comportamentos celulares diferentes.

A sinalização celular pode ser realizada pelo contato direto entre as células ou mediado por moléculas sinalizadoras secretadas.

A) Sinalização endócrina, hormônios são transportados pelo sistema circulatório e agem em células em locais distantes.

B) Sinalização parácrina, uma molécula secretada por uma célula irá agir em outras células vizinhas.

C) Sinalização autócrina, uma célula produz uma molécula sinalizadora para a qual ela também responde.

Aspectos gerais da sinalização celular corresponde a componentes de uma via de transdução de sinal onde as células respondem a combinações de sinais específicos mediados por moléculas sinalizadoras. Os componentes de uma via de transdução de sinal ativam um mecanismo que permite a uma célula influenciar o comportamento de outras sendo essencial à manutenção de organismos multicelulares e respondem a combinações de sinais específicos quando uma dada célula é exposta a centenas de sinais solúveis, sinais ligados à matriz extracelular, sinais ligados às células vizinhas.

Todas moléculas sinalizadoras agem por ligação com um receptor expresso na superfície celular, ou localizado no citoplasma ou núcleo. Hormônios esteroides e outros (Hormônio da tireoide, vitamina D3 e ácido retinóico) que são de características hidrofóbicas atravessam a membrana plasmática por difusão e agem diretamente em receptores citoplasmáticos ou nucleares.

Receptores nucleares ou intracelulares

- Receptores acoplados à proteína G
- Receptores Proteína tirosina quinase
- Receptores canais iônicos
- Receptores de citocinas
- Receptores acoplado a outras atividades enzimáticas

Segundos mensageiros

Apesar de as proteínas serem importantes para as vias de transdução de sinal, outras moléculas podem participar da mesma forma. Inúmeras vias envolvem segundos mensageiros, moléculas pequenas e não proteicas que repassam um sinal iniciado pela ligação do ligante (o “primeiro mensageiro”) a seu receptor.

Segundos mensageiros incluem íons de Cálcio, AMP cíclico (AMPc), um derivado do ATP e inositol fosfatos que são sintetizados a partir de fosfolípidos.

Os íons de cálcio são um tipo de segundo mensageiro amplamente utilizado, na maioria das células, a concentração dos íons de cálcio no hialoplasma é muito baixa, visto que as bombas de íons na membrana plasmática trabalham continuamente para removê-los. Com a finalidade de sinalização, pode ser armazenado em compartimentos, com o retículo endoplasmático.

Nas vias que utilizam os íons de cálcio como segundo mensageiro, eventos de sinalização a montante liberam um íon ligante que se vincula e abre os canais de receptores ionotrópicos. Estes canais se abrem e permitem que os altos níveis de íons presentes fora da célula (ou em compartimentos de armazenamento intracelular) fluam para o citoplasma, elevando a concentração plasmática de Cálcio. O Cálcio citoplasmático e nucleoplasmático podem ser regulados independentemente. A relativa contribuição do Cálcio citoplasmático e nucleoplasmático em processos biológicos tais como transcrição gênica, apoptose e proliferação celular já está consagrada da literatura científica.

Outro segundo mensageiro usado em diversos tipos de células é a adenosina monofosfato cíclica (AMP cíclica ou cAMP), uma molécula pequena produzida a partir de ATP. Em resposta aos sinais, uma enzima chamada adenil ciclase converte ATP em cAMP, removendo dois fosfatos e ligando o fosfato remanescente ao açúcar em forma de anel (por isso, o nome “cíclica”).

Depois de produzida, a cAMP pode ativar uma enzima chamada proteína quinase A (PKA), possibilitando que esta fosforile seus alvos e passe o

sinal adiante. A proteína quinase A é encontrada em uma variedade de tipos de células e, em cada tipo, suas proteínas-alvo variam. Desta forma, o mesmo segundo mensageiro cAMP pode produzir diversas respostas em diferentes contextos.

“hipótese de que a severidade ou presença de eventos de vida, estressores são preditivos de severidade ou presença de sintomas de ansiedade ou de transtornos de ansiedade têm sido alvo de estudos com adultos e adolescentes.

“Classicamente, um agente estressor é aquele que possui a capacidade para alterar a homeostasia, provocando a ativação do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal. Como exemplos de agentes estressores, pode-se citar fome, dor, calor/frio, ansiedade, medo, entre outros fatores.

Embora uma grande quantidade de variáveis fisiológicas seja responsiva aos estressores, muita atenção tem sido dada àquelas que direta ou indiretamente ativam o SNS e o Eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA) [7,8]”. “Os glicocorticoides, por sua vez, são os produtos da ativação do eixo HPA e da resposta central ao estresse. A este respeito, a corticosterona, da mesma forma que o cortisol em humanos pode ser usado como indicador de estresse, figura 3” [6,9,10].

“A relação cortisol - melatonina, hormônio

sintetizado pela glândula pineal, está envolvida em funções imunomodulatórias, anti-inflamatórias, antitumorais, antioxidantes e cronobióticas. Sua secreção ocorre à noite, estando relacionada com o sono, redução da temperatura corporal e outros eventos noturnos. Sua principal função em mamíferos é a de mediar sinais de escuridão, traduzindo informações sobre a duração da noite, com possíveis implicações no controle da ritmicidade circadiana e da sazonalidade. Complexas vias neuroanatômicas conectando o núcleo supraquiasmático do hipotálamo à glândula pineal regulam sua secreção. Sua concentração plasmática é pequena, chegando a ser indetectável em alguns indivíduos, e mesmos doses exógenas mínimas administradas durante o dia são capazes de induzir o sono em indivíduos normais [11].

O uso da Pinetonina™ melhorara a qualidade do sono, ao promover o equilíbrio emocional e o bem-estar reprimindo os níveis de cortisol e estimulando o aumento da Melatonina, fato esse que se assemelha ao padrão fisiológico humano, sem efeitos colaterais, diferentemente de diversas drogas hipnóticas, como os benzodiazepínicos, é por isso pode ser considerado promissor seu uso em tratamento de distúrbios de insônia.

Figura 3.

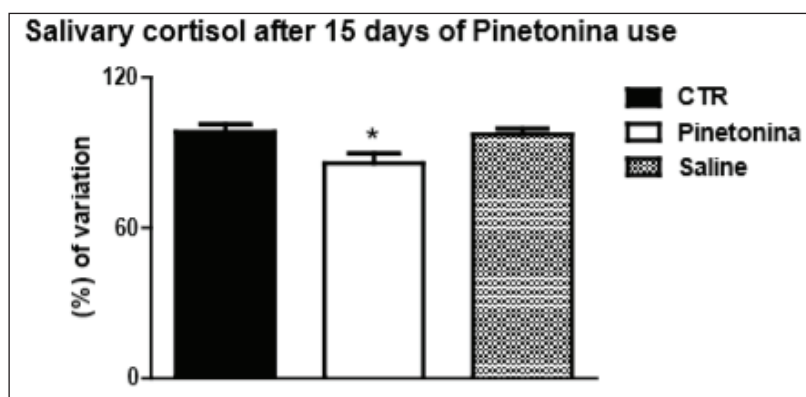


Figura 3. Variação do nível de cortisol salivar entre grupos de voluntários que receberam Pinetonina™, solução salina e sem tratamento. O grupo tratado com Pinetonina™ obteve menor média (%) quando comparado ao grupo controle (sem tratamento) e quando comparado ao grupo tratado com salina. (*) $P < 0,05$ - significativo em relação ao controle, ANOVA, Tukey. Ensaio realizado em triplicado. GraphPad Prism V.5.0, [6].

Nessa linha deste raciocínio propomos que o fito complexo Pinetonina™, atua como sinalizador celular promovendo atividade de transcrição em células específicas para formação dos hormônios aqui mencionados. Estudos a serem realizados pela equipe de pesquisadores do iooe.

Os resultados apresentados mostram que marcadores bioquímicos e níveis de íons podem ser usados como índices fisiológicos fidedignos de estados de estresse/ansiedade.

Em resumo, a importância das evidências científicas quanto aos alvos celulares alcançados pelos óleos essenciais é inquestionável até o momento. Entendemos ao mesmo tempo que a ação antioxidante e proliferativa promovida pelos óleos essenciais, estimulam a produção de gases como o Óxido Nítrico e consequente cascata das vias de sinalização celular e seus efeitos mediados por receptores, ligantes, segundos mensageiros como o cálcio entre outros. Assim, o iooe aumenta seu foco em afirmações científicas de comprovação da efetiva ação dos óleos essenciais em alvos celulares com dados biológicos moleculares confiáveis e já consagrados na literatura científica.

Referências bibliográficas

1. Carlos J. R. Oliveira; Fernanda Schindler; Armando M. Ventura; Miriam S. Morais; Roberto J. Arai; Victor Debbas; Arnold Stern; Hugo P. Monteiro: **Nitric Oxide and CGMP activate the Ras-Map Kinase pathway stimulating Protein Tyrosine Phosphorylation in Rabbit Aortic Endothelial Cells**: Free Radical Biology & Medicine, Vol. 35, No. 4, pp. 381-396, 2003. DOI:10.1016/S0891-5849(03)00311-3.
2. Carlos J. R. Oliveira; Marli F. Curcio; Miriam S. Moraes; Maristela Tsujita; Hugo P. Monteiro: **The low molecular weight S-nitrosothiol, S-nitroso-N-acetylpenicillamine, promotes cell cycle progression in rabbit aortic endothelial cells**: Nitric Oxide. Biology and Chemistry, v. 18, p. 241-255, 2008. DOI: 10.1016/j.niox.2008.02.001.
3. Oliveira, Pedro Gonçalves de; Castilho, João Cezar; Spindola, Daniel Gonsales; Trindade, Claudia Bincoletto; Oliveira, Carlos Rocha. **Avaliação in vitro da atividade do ácido hialurônico de baixo peso molecular sobre a proliferação de fibroblastos dérmicos humanos / In vitro Evolution of acid activity hyaluronic acid of low molecular weight on proliferation of human dermal fibroblasts**: Nursing (São Paulo);20(224):1552-1555, jan.2017. ilus.
4. Oliveira, P.G.; Castilho, J.C.; Souza, M.S.A.; Siqueto, F.R.; Silva, S.O.; Tamashiro, L.Y.; Spindola, D.G.; Cavalaro, V.; Oliveira, C.R: **Avaliação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais associados a ácido hialurônico de baixo peso molecular**: Revista Feridas, 2018; 06 (30) 996-1002.
5. Fernando Amaral; Maira Jardim; Valeria Maria de Souza Antunes; Luis Felipe Gomes Michelin; Bárbara Anaís Rodrigues dos Santos; Christiano Marcelo Vaz Barbosa; Daniel Gonsales Spindola; Claudia Bincoletto; Carlos Rocha Oliveira: **In Vitro Effects of the Phytocomplex TrichoTech™ on Human Fibroblasts: Proliferative Potential and Effects on Gene Expression of FGF-7 and FGF-10**: Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications, 2017, 7, 1-13. DOI: doi.org/10.4236/jcdsa.2017.71001.
6. Maira Jardim; Fernando Amaral; Valeria Maria de Souza Antunes; Fernando Rodrigues; Mariana Soares Alves de Souza; Fernanda Rossi Siqueto; Luiza Melanie Silva; Rafaela Alves Bertolino; Victor Cavalaro; Carlos Rocha Oliveira; **Pinetonina™, an Intranasally Administered Essential Oil Preparation, Is Effective in Decrease of Cortisol Levels and on the Glutamate Release Modulation**: Neuroscience & Medicine, 2018, 9, 135-149.
7. Natelson, B.H.; Creighton, D.; McCarty, R.; Tapp, W.N.; Pitman, D.; Ottenweller, J.E. (1987) . **Adrenal hormonal indices of stress in laboratory rats**. Physiol. Behav. 39:117-125
8. Verano, J.L.; Grassi-Kassisse, D.M.; Spadari-Bratfisch, R.C. (2001) **Metabolic markers following beta-adrenoceptor agonist infusion in footshock-stressed rats**. Braz J Med Biol Res. 34(9)1197-1207.
9. De Kloet, E.R.; Joëls, M.; Holsboer, F. (2005) **Stress and the brain: from adaptation to disease**. Nature Reviews. 6:463-475.
10. Charmandari, E.; Tsigos, C.; Chrousos, G. (2005) **Endocrinology of the stress response**. Annu Rev. Physiol. 67:259-284
11. Júlio Anselmo Sousa Neto; Bruno Freire de Castro: **Melatonina, ritmos biológicos e sono** - uma revisão da literatura: Revista Brasileira de Neurologia, 44 (1): 5-11. 2008.