

Universidade Federal de Juiz de Fora  
Pós-graduação em Ciências Biológicas

Erick Esteves de Oliveira

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Ocimum gratissimum* E *Mentha x villosa* EM LINHAGEM DE CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA HUMANO DE PULMÃO: CITOTOXICIDADE, CICLO CELULAR E PRODUÇÃO DE TGF- $\beta$ 1**

Juiz de Fora  
2015

**ERICK ESTEVES DE OLIVEIRA**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Ocimum gratissimum* E *Mentha x villosa* EM LINHAGEM DE CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA HUMANO DE PULMÃO: CITOTOXICIDADE, CICLO CELULAR E PRODUÇÃO DE TGF- $\beta$ 1**

**Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas: Área: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias**

**Orientadora: Dra. Ana Paula Ferreira**

Juiz de Fora

2015

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos órgãos de fomento, FAPEMIG, CNPq e CAPES, que proveram os recursos necessários para a realização deste trabalho.

Agradeço a Deus por tudo, pelos momentos difíceis sem os quais não é possível crescer, pelos momentos felizes que me confortam, por minha família e meus amigos que sempre estiveram ao meu lado. Agradeço a oportunidade de viver, de errar e de ter a oportunidade de aprender com meus erros, e peço uma única coisa: que eu amanheça a cada dia uma pessoa melhor.

À minha família, por ser o berço onde aprendi muito do que sou hoje, e por terem sido meus exemplos de luta e perseverança.

Aos meus pais, por sempre terem lutado por mim, por acreditarem nos meus sonhos e por terem me dado amor, que é maior bem que possuo.

Ao meu irmão e minha avó, que vibram a cada passo dessa caminhada.

Ao meu companheiro, Bruno, pela paciência e compreensão nos momentos de ausência, e por dividir comigo muitas de minhas conquistas.

À minha irmã de coração, Danielle, pelos conselhos, pelas aventuras, pelos puxões de orelha, pelas alegrias e por todos os apertos que passamos juntos desde o primeiro dia da graduação.

Aos meus amigos da graduação; Juliana, Bárbara, Rafael e Daniel que, de alguma forma, estão sempre ao meu lado.

À minha orientadora, Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Ferreira, pela confiança e por assumir minha orientação, mesmo frente a tantos compromissos. Obrigado também por ter aberto as portas para muitas outras oportunidades.

Aos meus amigos do IMUNOCET:

Bárbara, Ana Márcia, Alexandre, Caroline e Lily; que mesmo não compartilhando o mesmo orientador, não deixamos de dividir bons momentos.

Flávia, Leandra, Marcilene, Fernanda, Alessa, Ana Cláudia, Alyria, Marcela, Wesley, Marina, Fabiana e Raíssa; por fazerem os dias de trabalho mais leves.

Aos meus amigos da turma de mestrado, Luan e Ana, por dividirem comigo os desesperos e os desafios, e pelo companheirismo nesses últimos dois anos.

Aos meus amigos de bancada, Caio e Sandra, que tanto contribuíram para a conclusão deste e de outros trabalhos. Obrigado por estarem sempre disposta a ajudar e a tirar minhas dúvidas.

Às funcionárias do laboratório Sirlei e Leidiana, por zelarem pelo bom funcionamento do nosso ambiente de trabalho e por estarem sempre na torcida para que tudo corresse bem.

Aos professores Daniel Pimenta e Luciana Chedier, pelo auxílio na extração dos óleos essenciais e na análise de sua composição.

Aos professores da Imunologia Henrique, Gilson, Jacy e Juciane e seus grupos de pesquisa, pelos conselhos valiosos e pela amizade.

À banca examinadora Juciane e Maria Aparecida, e às suplentes Heloisa e Wanessa pelos conselhos e pelas ideias que enriqueceram as discussões aqui apresentadas. Obrigado por terem interrompido suas atividades para se dedicarem à avaliação e construção desse trabalho.

Enfim, agradeço a todos, mesmo aqueles cujos nomes não foram citados, que de alguma forma contribuíram para que eu chegasse aqui.

## RESUMO

**Introdução:** *Ocimum. gratissimum* L. e *Mentha x villosa* Huds. são duas plantas aromáticas que são amplamente utilizadas no Brasil e em outros países tanto para fins terapêuticos, como na culinária. Diversas atividades farmacológicas já foram descritas para essas duas plantas e para os componentes majoritários de seus óleos essenciais, Eugenol e Óxido de Piperitenona, respectivamente. Porém ainda há a carência de estudos sobre a atividade antiproliferativa desses óleos essenciais sobre linhagens tumorais e as implicações desses compostos sobre a produção de TGF- $\beta$ 1, uma citocina que, em tumores já estabelecidos, apresenta efeito pró-tumoral. Esse estudo visa avaliar os efeitos dos tratamentos com os óleos essenciais de *O. gratissimum* e *M. x villosa*, sobre uma linhagem de adenocarcinoma humano de pulmão produtora de TGF- $\beta$ 1. **Métodos:** A viabilidade celular foi avaliada através do ensaio de MTT em linhagens de células (A549 e J774 A.1) e em macrófagos intraperitoneais tratados com 5 a 200 $\mu$ g/mL, por 48h. O efeito dos óleos essenciais sobre o ciclo celular foi avaliado através de marcação com iodeto de propídio e quantificação das fases de ciclo celular por citometria de fluxo. A quantificação de células em SubG1 foi utilizada como parâmetro para avaliação de apoptose, que foi confirmada através da marcação de TUNEL. A produção de TGF- $\beta$ 1 foi avaliada por ELISA. **Resultados:** Os dois óleos essenciais reduziram a viabilidade da linhagem celular A549 (IC50: OG:160 $\mu$ g/mL / MV:117 $\mu$ g/mL), os tratamentos também induziram parada do ciclo celular em S com 24h de tratamento (controle: 12,31 $\pm$ 0,89 / OEOG: 15,70 $\pm$ 1,15 / OEMV: 23,35 $\pm$ 0,75) efeito já registrado para eugenol. Também houve aumento do percentual de células em SubG1 (controle: 15,05 $\pm$ 0,71 / OEOG: 91,94 $\pm$ 1,71 / OEMV:24,62 $\pm$ 1,06), indicando aumento da fragmentação de DNA, um dos sinais de apoptose, que foi confirmado pelo aumento da mediana de fluorescência na marcação de TUNEL (controle:59.1 $\pm$ 3.4 / OEOG:68.6 $\pm$ 3.7 / OEMV:75.3 $\pm$ 15.7). Houve redução da produção de TGF- $\beta$ 1 nas concentrações não letais dos óleos essenciais (10 e 50 $\mu$ g/mL). **Conclusões:** Esses dados demonstram o potencial indutor de apoptose e de parada de ciclo celular, desses óleos essenciais para o tratamento de tumores, sobretudo aqueles caracterizados pela produção de TGF- $\beta$ 1, citocina importante para a sobrevivência e proliferação de células tumorais. Contudo, essa citocina desempenha papéis importantes na

homeostase do organismo, e por isso são necessários estudos que avaliem o efeito sistêmico desses óleos essenciais.

**Palavras chaves:** Óleo essencial, *Mentha x villosa*, *Ocimum gratissimum*, Ciclo Celular, Apoptose, TGF- $\beta$ .

## ABSTRACT

**Introduction:** *Ocimum. gratissimum* L. and *Mentha x villosa* Huds are aromatic plants largely used, in Brazil and other countries, for therapeutic and culinary purposes. Several pharmacological properties have been described for their essential oil and their major compounds: Eugenol and piperitenone oxide respectively. However, the antiproliferative effect and the blockage of the TGF- $\beta$ 1 production are poorly understood. This cytokine contributes for the development of late-phase tumors. This study aimed to evaluate the effects of the essential oils of *Ocimum gratissimum* and *Mentha x villosa* over a TGF- $\beta$ 1 producer human lung adenocarcinoma cell line. **Methodology:** Viability was assessed through MTT assay, on cell lineages (A549 and J774 A.1) and intraperitoneal macrophages treated for 48h with essential oil concentrations ranging from 5 to 200 $\mu$ g/mL. Cell cycle and SubG1 DNA amount was evaluated through propidium iodide staining followed by flow cytometry analysis. TUNEL assay was used to quantify the DNA fragmentation. ELISA was performed to measure the TGF- $\beta$ 1 production. **Results:** Both essential oils reduced A549 cell viability (IC50: EOOG:160 $\mu$ g/mL / EOMV:117 $\mu$ g/mL), there was also cell cycle arrest at S phase, after 24hours of treatment (control: 12,31 $\pm$ 0,89 / EOOG: 15,70 $\pm$ 1,15 / EOMV: 23,35 $\pm$ 0,75). SubG1 DNA amount was also elevated after treatment (control: 15,05 $\pm$ 0,71 / EOOG: 91,94 $\pm$ 1,71 / EOMV:24,62 $\pm$ 1,06), an indicative of DNA fragmentation, one of the apoptosis sign. This effect was confirmed by the elevated TUNEL labeling. The non-lethal concentrations of the essential oils (10 and 50 $\mu$ g/mL) led to the reduction of TGF- $\beta$ 1 production. **Conclusion:** These data indicates the apoptotic and cell cycle arrest effects of the essential oils, mainly over TGF- $\beta$ 1 producing tumors. As this cytokine has a key role over the survival and proliferation of these cancer cells. The possible systemic effects of these treatments are yet to be evaluated, as the TGF- $\beta$ 1 blockage may affect the maintenance of homeostasis.

**Keywords:** Essential oil, *Mentha x villosa*, *Ocimum gratissimum*, Cell Cycle, Apoptosis, TGF- $\beta$ .

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<b>Figura 1</b> - Imagem representativa das fases do ciclo celular.....	16
<b>Tabela 1</b> - Composição dos óleos essenciais de <i>Ocimum gratissimum</i> e <i>Mentha x villosa</i> .....	30
<b>Tabela 2</b> – Avaliação da viabilidade das linhagens J774 A.1 e A549 tratadas com OEOG e OEMV. ....	32
<b>Figura 2</b> - Avaliação da viabilidade das linhagens J774 A.1 e A549 tratadas com OEOG e OEMV.. ....	33
<b>Tabela 3</b> – Viabilidade de células da linhagem A549 tratadas com OEOG e Eugenol. ....	35
<b>Figura 3</b> - Viabilidade de células A549 tratadas com OEOG ou com Eugenol.....	35
<b>Tabela 4</b> – Viabilidade de macrófagos intraperitoneais tratados com OEOG e OEMV. ....	37
<b>Figura 4</b> - Avaliação da viabilidade celular de macrófagos intraperitoneais tratados com OEOG e OEMV.....	37
<b>Figura 5</b> – Análise da fragmentação de DNA em células da linhagem J774 A.1 tratadas com OEOG.....	40
<b>Figura 6</b> – Análise da fragmentação de DNA em células da linhagem J774 A.1 tratadas com OEMV. ....	41
<b>Figura 7</b> - Análise da fragmentação de DNA em células da linhagem A549 tratadas com OEOG.....	42
<b>Figura 8</b> - Análise da fragmentação de DNA em células da linhagem A549 tratadas com OEMV.....	43
<b>Figura 9</b> – Análise do ciclo celular em células das linhagens A549 tratadas com OEOG e OEMV, quantificação de células em fase G1.. ....	45
<b>Figura 10</b> – Análise do ciclo celular em células das linhagens A549 e J774 A.1 tratadas com 50 µg/mL de OEOG .....	46
<b>Figura 11</b> – Análise do ciclo celular em células das linhagens A549 e J774 A.1 tratadas com 50 µg/mL de OEMV .....	47
<b>Figura 12</b> – Análise de apoptose através da técnica de TUNEL em células das linhagens A549 e J774 A.1 tratadas com OEOG e OEMV .....	49

**Figura 13** – Avaliação dos níveis de TGF- $\beta$ 1 no sobrenadante de cultura de células A549 tratadas com OEMV e OEOG ..... 51

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – “Analysis of variance” / Análise de Variância

CDK – “Cyclin-dependent Kinase” / Quinase Dependente de Ciclina

DMSO – Dimetil-Sulfóxido

DNA – “Deoxyribonucleic Acid” / Ácido desoxirribonucleico

ELISA – Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay” / Ensaio Imuno-Adsorvente Ligado à Enzima

EMT – “Epithelial Mesenchymal Transition” / Transição Epitélio-Mesenquimal

IC50 – Concentração Inibitória de 50%

IFN- $\gamma$  - Interferon gama

MTT – “3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide”

NSCLC – “Non-Small Cell Lung Cancer” / Câncer de Pulmão de Células Não-Pequeenas

OEMV – Óleo essencial de *Mentha x villosa*

OEOG – Óleos essencial de *Ocimum gratissimum*

PI – “Propidium Iodide” / iodeto de propídio

pRB – “Retinoblastoma protein” / Proteína do Retinoblastoma

SCLC – “Small Cell Lung Cancer” / Cancêr de Pulmão de Células Pequenas

TGF- $\beta$  - “Transforming Growth Factor – Beta” / Fator de Transformação do Crescimento – Beta

TNF- $\alpha$  - Tumor Necrose Factor–Alpha / Fator de Necrose tumoral alfa

TUNEL – “Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling” / Marcação de terminais de quebra

VBL - Vinblastina

VCR - Vincristina

## **Sumário**

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
1.1 ASPECTOS GERAIS DO CÂNCER .....	13
1.2 ÓLEOS ESSENCIAIS NO TRATAMENTO DO CÂNCER .....	19
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	22
2.1 OBJETIVO GERAL .....	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	22
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	23
3.1 REAGENTES .....	23
3.2 COLETA DE MATERIAL VEGETAL E EXTRAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL	23
3.3 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPONENTES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	23
3.4 OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS INTRAPERITONEAIS.....	24
3.5 CULTURA DE CÉLULAS .....	24
3.6 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR .....	25
3.7 ANÁLISE DE CICLO CELULAR EM MARCAÇÃO COM IODETO DE PROPÍDIO .....	26
3.8 MÉTODO DE TUNEL .....	27
3.9 DOSAGEM DE TGF- $\beta$ 1 NO SOBRENADANTE DE CULTURA DE CÉLULAS A549.....	27
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	28
<b>4 RESULTADOS</b> .....	29
4.1 COMPOSIÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS .....	29
4.2 EFEITO DE OEOG E OEMV SOBRE A VIABILIDADE DAS LINHAGENS J774 A.1 E A549 .....	31
4.3 EFEITO DO EUGENOL NA VIABILIDADE DA LINHAGEM DE CÉLULAS A549 .....	34
4.4 EFEITOS DE OEOG E OEMV SOBRE A VIABILIDADE DE MACRÓFAGOS PRIMÁRIOS .....	36

4.5 AVALIAÇÃO DA FRAGMENTAÇÃO DE DNA .....	38
4.6 CICLO CELULAR .....	43
4.7 AVALIAÇÃO DE APOPTOSE ATRAVÉS DO ENSAIO DE TUNEL .....	47
4.8 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE TGF- $\beta$ 1 NAS CÉLULAS TRATADAS COM OEOG E OEMV .....	49
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>51</b>
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>55</b>
<b>7 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>56</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Aspectos gerais do Câncer

Os cânceres são um conjunto de diversas doenças de grande importância e ampla distribuição, que apresentam em comum o crescimento anormal e a invasão tecidual. Podendo ser ocasionado por fatores internos (Hormônios e oncogenes) e externos (Alimentação, consumo de drogas e infecções) (ACS, 2014).

Estima-se que para o ano de 2015 ocorrerão 15 milhões de novos casos de câncer no mundo, podendo levar mais de 8 milhões de pessoas à morte (GLOBOCAN, 2012). Em 2011, essa doença foi responsável por mais de 17.000 mortes (INCA, 2013). Espera-se que a maior exposição a fatores de risco, em países desenvolvidos, ocasione aumento da incidência da doença. Contudo, os avanços nos tratamentos e no diagnóstico impedem o crescimento das taxas de mortalidade (Revisado JEMAL *et al.* 2011).

Em estudo realizado durante mais de duas décadas nas capitais brasileiras, foi observada a redução da mortalidade por câncer, ocasionada principalmente pelos avanços na prevenção secundária e no tratamento. Porém, a análise isolada das mortes por câncer de pulmão não revelaram queda significativa (FONSECA, ELUF-NETO e WÜNSCH FILHO, 2010).

Levantamentos da Organização Mundial de Saúde (OMS) revelam que o câncer de pulmão é o mais mortal entre os homens e mulheres, apresentando mortalidade menor que os cânceres de próstata e mama respectivamente (WHO, 2014).

O tabagismo se destaca como o fator de maior importância na ocorrência de câncer de pulmão, desde 1950, quando Doll e Hill relataram que a maior incidência da doença entre indivíduos fumantes, principalmente entre aqueles expostos por longos períodos ao cigarro. Do total de mulheres que morreram devido a essa doença estima-se que 50% tenha desenvolvido a doença devido ao tabagismo, enquanto entre os homens essa taxa seria de 80% (JEMAL *et al.*, 2010).

Outro fator que também contribui para a manutenção das altas taxas de incidência de câncer de pulmão é o aumento da poluição do ar por materiais particulados, que apesar de ser um fator de risco relativamente pequeno, apresenta

um alcance populacional grande (Revisado por FAJERSZTAJN *et al.* 2013). Esse tipo de poluição tende a crescer com o nível de desenvolvimento do país.

O adenocarcinoma se distingue dos demais tumores de pulmão por apresentar uma incidência elevada em indivíduos não fumantes. Mesmo que haja dificuldade de se estabelecer um fator causal para esse tipo de câncer, a inalação profunda de fumaça de cigarro ambiental, por fumantes passivos, e a exposição ocupacional a outros poluentes são importantes fatores de risco para a ocorrência da doença (DELA CRUZ, TANOUE e MATTHAY, 2011). No Brasil isso é evidenciado pela maior mortalidade de mineiros por câncer de pulmão, quando comparados com outros trabalhadores que não apresentam exposição ocupacional a potenciais carcinógenos (VERÍSSIMO, MENDONÇA e MEYER, 2013).

O câncer de pulmão pode ser basicamente classificado em dois tipos, o câncer de pulmão de células pequenas (SCLC, do inglês "*small cell lung cancer*") e o de células não pequenas (NSCLC, do inglês "*non-small cell lung cancer*"), que correspondem a 15% e 85% dos casos desse câncer respectivamente. O câncer de pulmão de células pequenas, apesar da possibilidade de ocorrência de resistência aos tratamentos, é sensível a tratamentos com radioterapia e quimioterapia, e a cirurgia raramente é recomendada (KALEMKERIAN *et al.*, 2013). Os "cânceres de pulmão de células não-pequenas", que incluem o carcinoma escamoso, o carcinoma de células grandes e o adenocarcinoma, são agrupados por apresentarem similaridades desde o diagnóstico até o tratamento. Esses cânceres geralmente apresentam resistência intrínseca à quimioterapia (ETTINGER *et al.*, 2012).

A quimioterapia, em grande parte dos casos de cânceres de pulmão de células não-pequenas, era utilizada como paliativo, tendo em vista a incapacidade de cura nos estágios em que a doença era comumente detectada. Contudo, os avanços no diagnóstico do câncer de pulmão, e a detecção precoce, levaram ao aumento do uso de quimioterapia com finalidade curativa (PATEL *et al.*, 2007).

Um dos problemas enfrentados nos tratamentos de cânceres de pulmão, sobretudo aqueles de células não-pequenas, é o desenvolvimento de resistência a drogas. Nesses casos uma medida comum é o aumento da dosagem da droga, que é acompanhado pelo aumento dos efeitos tóxicos do tratamento (Revisado por SHANKER *et al.*, 2010; CHANG, 2011). Por isso são necessários estudos que busquem novas drogas para o tratamento do câncer e formas de inibir os mecanismos de resistência do tumor.

Apesar da grande diversidade de cânceres existentes, há o compartilhamento de algumas características marcantes dessas doenças. Hanahan e Weinberg (2000) enumeraram a autossuficiência de fatores de crescimento, a evasão da apoptose, a não sensibilidade a fatores inibição de crescimento, a angiogênese sustentada, a invasão tecidual e o potencial replicativo ilimitado como as principais marcas dos cânceres. Contudo, novas marcas tem se mostrado importantes no desenvolvimento dessas doenças, a desregulação do metabolismo energético, a evasão ao sistema imune, a instabilidade genômica e a inflamação são características que se destacaram mais recentemente (HANAHAN & WEINBERG, 2011)

Devido à importância das alterações de ciclo celular, ele tem sido o alvo de diversas terapias recentemente propostas, principalmente com o intuito de induzir arrastes, ou paradas nesse ciclo. Alguns trabalhos demonstram que compostos sintéticos, anticorpos monoclonais e extratos vegetais são capazes de reduzir a entrada de células na fase de síntese (S), havendo acúmulo de células em G1, geralmente através da inibição a sinalização de ciclinas dependentes de quinase (CDKs) ou de fatores de transcrição ligados à progressão no ciclo celular e com isso inibindo a proliferação celular (LIN *et al.*, 2014; COCHONNEAU *et al.* 2013; TRAN *et al.*, 2014).

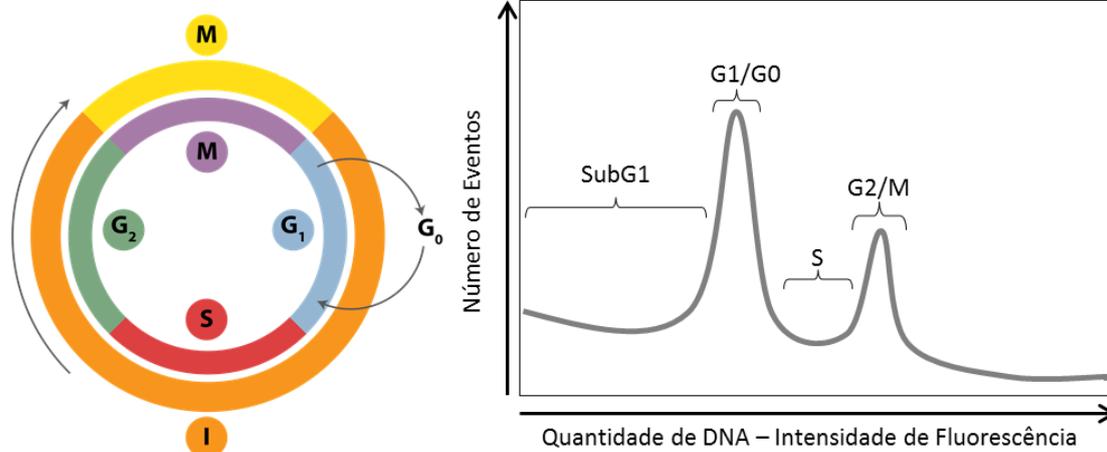
Tratamentos que tenham como alvo proteínas reguladoras do ciclo celular também podem levar ao arraste nas fases subsequentes (S e G2/M) e geralmente, essas paradas são acompanhadas de morte por apoptose (ZHAO *et al.* 2014; HU *et al.*, 2014; BO *et al.*, 2014). Apesar da associação entre os mecanismo de apoptose e estagnação do ciclo celular não estarem bem estabelecidos, células em constante divisão celular são resistentes à indução de apoptose (HASHIMOTO *et al.*, 2012). Portanto, mecanismos de indução de arraste, que evitem que células tumorais se proliferem constantemente, são capazes de torná-las suscetíveis a tratamentos anticâncer que induzam apoptose.

O ciclo celular é dividido em intervalos com características específicas, a fase G1 (do inglês *gap 1*) separa a última divisão celular da fase de síntese (fase S), quando o DNA é replicado. O segundo intervalo, ou fase G2 (do inglês *gap 2*) antecede a mitose. A transição entre essas etapas depende da finalização da fase anterior. Nesses pontos de checagem (*checkpoints*) há a participação de moléculas, que verificam se aquela fase foi concluída, e moléculas efetoras que iniciam as mudanças da fase subsequente, entre essas moléculas destacam-se as ciclinas e

quinases dependentes de ciclina (CDKs – do inglês “*Cyclin-dependent kinases*”) (revisado por URREGO *et al.*, 2014).

Intercalantes de DNA são usualmente utilizados em avaliações do ciclo celular através de citometria de fluxo. Nessa técnica observa-se claramente dois acúmulos de eventos, um que indica células em G1 e outro com células contendo o dobro de DNA, G2/M. O intervalo entre os dois picos (G1 e G2) corresponde à fase de síntese (S) onde quantidades intermediárias de DNA são observadas. Os eventos com quantidade de DNA inferior a G1, chamados de SubG1 correspondem a células com DNA fragmentado, um indicativo de morte celular programada (RICCARDI e NICOLETTI, 2006; LOOS *et al.* 2014; TRAN *et al.* 2014). (Figura 1)

Uma das importantes características de células tumorais é sua capacidade de permanecer em constante estado de proliferação celular, mesmo na ausência de estímulos. Essa proliferação intensa ocorre principalmente pela falha nos mecanismos de regulação do ciclo celular (como por exemplo as falhas na produção de proteína pRB – proteína retinoblastoma, e o não funcionamento das quinases que a fosforilam), que atuam no final da fase G1 (EVAN e VOUSDEN, 2001).



**Figura 1** – Imagem representativa das fases do ciclo celular: Gap1 (G1), Síntese (S), Gap2 (G2), Mitose (M), Intérfase (I). Histograma simulando uma avaliação de ciclo celular por citometria de fluxo utilizando um intercalante de DNA. Estão indicadas as fases do ciclo celular e a quantidade de DNA correspondente.

O câncer apresenta algumas importantes características, as quais resultam basicamente na promoção da proliferação e evasão dos mecanismos de morte celular. Nesses processos a citocina *Fator Beta de transformação do crescimento* (TGF- $\beta$  - do inglês Transforming Growth Factor) tem grande importância (HANAHAN e WEINBERG, 2011). Essa molécula atua na regulação da proliferação e

diferenciação celular, podendo intensificar ou inibir a transcrição de diversos genes. Nesses processos o contexto das células expostas ao TGF- $\beta$  é o fator que determinará o tipo de resposta que será gerada (Revisado por MASSAGUÈ, 2012).

Conhecido pelo seu efeito supressor sobre tumores, devido a sua capacidade de inibir a proliferação celular, o TGF- $\beta$  também pode exercer um papel pró-tumoral em caso de defeitos em moléculas subsequentes em suas vias de sinalização. Neste contexto, em células normais e em tumores em fase inicial há atividade supressora do tumor pelo TGF- $\beta$ , mas em tumores de fase tardia sua sinalização tem o efeito oposto, promovendo a proliferação celular e a metástase (DERYNC *et al.*, 2001; LEBRUN, 2012). Essa citocina também confere resistência à indução de apoptose por radioterapia, através da redução do dano ao DNA causado pela radiação gama (AN *et al.*, 2013). Apesar da influência do TGF- $\beta$  no desenvolvimento tumoral ainda não estar completamente compreendida, sabe-se que pacientes com níveis séricos elevados desta citocina apresentam um prognóstico ruim e taxa de sobrevivência pequena (KUMAR *et al.*, 2011).

Um dos fatores associado ao prognóstico ruim no câncer, sobretudo no câncer de pulmão, é a ocorrência de transição epitélio-mesenquimal (EMT) das células tumorais, fator crucial para a ocorrência de metástase. Essa transição gera perda da interação entre as células e aumento de sua mobilidade, o que ocorre através de uma reprogramação da célula, havendo supressão da expressão de moléculas de adesão e proteínas de polaridade. O TGF- $\beta$  participa ativamente deste processo tanto induzindo a EMT, através da alteração da expressão de uma variedade de genes, como criando um microambiente propício para o desenvolvimento tumoral, através da regulação de células do sistema imune no local do tumor, fazendo com que percam sua atividade tóxica (FUXE e KARLSSON, 2012).

No câncer de pulmão, a constante sinalização de TGF- $\beta$  é importante para manter o fenótipo de célula mesenquimal, e sua privação implica em retorno para a condição epitelial. E, em ensaios *in vitro*, com células de câncer de pulmão-não pequenas, o constante estímulo com TGF- $\beta$  é essencial para a manutenção da resistência dessas células ao tratamento com medicamento padrão (YAO *et al.*, 2010).

Além dos efeitos do TGF- $\beta$  sobre as células tumorais, ele também é capaz de modular o sistema imune no microambiente tumoral, induzindo um perfil tolerogênico que favorece a progressão do tumor (FLAVELL *et al.*, 2010). Além disso, o TGF- $\beta$  de origem tumoral atua sobre linfócitos T citotóxicos e células NK, células importantes no combate ao tumor, diminuindo sua capacidade citolítica, através do aumento da expressão de miRNAs que tem como alvo a proteína DAP12, molécula adaptadora de grande importância para a atividade citotóxica de células NK (DONATELLI *et al.* 2014).

O TGF- $\beta$  tem grande importância no ciclo celular, e apesar de sua função proliferativa em células embrionárias, em células maduras esta citocina promove o arraste em G1, sobretudo na etapa final dessa fase, quando os complexos pré-replicativos já estão formados inibindo sua atividade helicase essencial para o início do processo de replicação (MUKHERJEE *et al.*, 2010). A sinalização de TGF- $\beta$  leva ao acúmulo de proteínas *Smad* no núcleo, onde elas formam complexos que podem afetar a transcrição de diversos genes, muitos deles ligados ao arraste das células na fase G1. Por isso, células tumorais de fase tardia, que acumulam defeitos nas proteínas responsáveis pela sinalização de TGF- $\beta$  perdem esse controle do ciclo celular. (Revisado por MASSAGUÈ, 2004).

## 1.2 Óleos essenciais no tratamento do câncer

Muitos dos tratamentos atuais para câncer são oriundos de plantas. Os primeiros compostos a serem utilizados foram os derivados da Vinca (*Catharanthus roseus* G. Don.) vincristina (VCR) e vinblastina (VLB), e, a partir desses compostos, novos análogos foram criados. Muitos desses compostos com atividade antitumoral foram descobertos devido a seus efeitos sobre o ciclo celular e por isso esse tipo de avaliação tem grande importância na descoberta e desenvolvimento de novas drogas antitumorais. (Revisado por CRAGG e NEWMAN, 2005).

A etnobotânica e a etnofarmacologia tem grande importância na descoberta de novos compostos de origem vegetal. Vários extratos e plantas, utilizadas por populações tradicionais para o tratamento das mais diversas doenças e distúrbios de saúde, quando submetidos a testes iniciais de avaliação de ciclo celular, apoptose e citotoxicidade em células tumorais revelam potencial anticâncer (revisado por HEINRICH e BREMNER, 2006).

Estudo realizado com populações rurais e urbanas do Brasil revelou que *Ocimum gratissimum* L. e *Mentha x villosa* Huds estão entre as plantas mais relevantes da medicina popular no país. Essas plantas geralmente são indicadas para algumas distúrbios de saúde em comum, como colesterol alto, cólicas menstruais e febre (MEDEIROS *et al.* 2013).

*Ocimum gratissimum* L (Lamiaceae), popularmente conhecida como alfavaca, é uma planta aromática de pequeno porte. No Brasil, na Índia e na África, esta planta é amplamente utilizada na medicina tradicional e para finalidades culinárias (revisado por PRABHU *et al.* 2009). Comunidades de pescadores artesanais do sudeste brasileiro utilizam *O. gratissimum* para problemas digestivos (BAPTISTA *et al.* 2013), populações indígenas do sul do país fazem o uso da planta para tratamento de dor de dente, gripe e como cicatrizante (MOURA-COSTA *et al.* 2012).

O óleo essencial de *O. gratissimum* tem sido utilizado, em estudos experimentais, devido à sua atuação sobre o sistema nervoso central, prolongando o tempo de sono induzido, e exibindo atividades antinociceptiva, ansiolítica e antidepressiva (FREIRE *et al.*, 2006; TANKAM e ITO, 2014; SARRAF *et al.* 2013).

O eugenol (4-Alil-2-Metoxifenol) é o composto majoritário do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* representando em torno de 70% de sua composição (SILVA *et al.* 2012; PAULA-FREIRE *et al.*, 2013). Esse composto também é encontrado em *Pimenta racemosa*, *Syzygium aromaticum* e *Cinnamomum verum* tendo sido

registradas atividades antisséptica , anti-inflamatória, analgésica e anticâncer (PHILLIPS *et al.*, 1990; SUKUMARAN *et al.*, 1994; THOMSON *et al.*, 1984, GHOSH *et al.*, 2005; ASHCA *et al.*; 2001; JAGANATHAN *et al.*, 2011; YOO *et al.*, 2005)

Nas linhagens de células de câncer de cólon humano HCT-15 e HT29, o eugenol foi capaz de induzir apoptose (JAGANATHAN *et al.* 2011), resultados semelhantes foram obtidos em células de leucemia promielocítica humana (HL-60), em que foi demonstrada a indução de apoptose mediada por espécies reativas do oxigênio (ROS - do inglês *reactive oxygene species*) (YOO *et al.*, 2005). Em modelo de indução de câncer de pulmão *in vivo*, o extrato aquoso de cravo, planta rica em eugenol, demonstrou atividades quimiopreventiva (BANERJEE *et al.*, 2006) mesmo que nesse trabalho não tenha sido feita a dosagem de eugenol no extrato, é possível que o efeito seja atribuído a esse componente que é abundante nessa espécie.

*Mentha x villosa*, espécie vegetal rasteira popularmente conhecida como hortelã-miúda, também é amplamente utilizada por diversas populações tradicionais do Brasil. No nordeste semi-árido é a segunda espécie exótica com maior relevância e que apresenta efeitos sobre vários sistemas do corpo humano (CARTAXO *et al.*, 2010), sendo essa espécie geralmente cultivada nas casas daqueles que a utilizam, muitas vezes no combate a parasitoses (OLIVEIRA *et al.*, 2010). No sul e sudeste do país, estudos relatam a mesma versatilidade no uso da hortelã-miúda e alta frequência de relatos de utilização por populações tradicionais (MEDEIROS *et al.*, 2012; MAIA *et al.*, 2011).

O óxido de piperitenona, ou epoxipulegona, é o componente majoritário do óleo essencial da hortelã-miúda, e é conhecido por sua propriedade antinociceptiva (SOUSA *et al.*,2009). O óleo essencial dessa espécie é capaz de bloquear contrações de musculatura esquelética (FOGAÇA *et al.*, 1998) e induzir efeitos hipotensivos devido a vasodilatação (LAHLOU *et al.*, 2001). Porém, diferentemente do eugenol, composto majoritário do óleo essencial de *O. gratissimum*, este composto ainda carece de avaliação quanto à propriedades antiproliferativa em células tumorais.

Os óleos essenciais são metabólitos secundários aromáticos que protegem as plantas da herbivoria e do desenvolvimento de micro-organismos. Além disso, apresentam diversas atividades, dentre as quais podemos destacar as atividades

antimicrobiana, anti-inflamatória, analgésica, antioxidante, antiviral e anticâncer (revisado por BAKKALI *et al.*, 2008).

Diversas são as formas de atuação dos óleos essenciais que resultam em suas atividades anticâncer. Estes compostos aromáticos podem apresentar efeitos antioxidantes, antimutagênicos e desentoxicantes, importantes principalmente na quimioprevenção, ou seja, favorecendo o não desenvolvimento do câncer através do controle de fatores que podem provoca-lo. Também inibem a proliferação celular, modulam o sistema imune para intensificar sua resposta e diminuem a capacidade de resistência a drogas por parte dos tumores. (revisado por BHALLA *et al.*,2013)

Tendo em vista o potencial terapêutico dos óleos essenciais das plantas supracitadas, e a carência de drogas com atividade anti-câncer, é importante avaliar a ação dessas espécies frente a linhagens de células tumorais. Além disso é necessário que haja uma melhor compreensão dos mecanismos de ação do óleo essencial de *Ocimum gratissimum*, cujo composto majoritário possui atividades antitumorais.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial antitumoral dos óleos essenciais de *Ocimum gratissimum* L. e *Mentha x villosa* Huds. sobre células da linhagem de adenocarcinoma humano de pulmão, A549.

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a composição dos óleos essenciais de *Ocimum gratissimum* (OEOG) e *Mentha x villosa* (OEMV);
- Avaliar o efeito do OEOG e do OEMV sobre a viabilidade de células das linhagens A549 e J774 A.1, e macrófagos intraperitoneais primários murinos, através de ensaio de MTT;
- Investigar se o tratamento com esses óleos essenciais é capaz de gerar alterações no ciclo celular dessas células, através de marcação com Iodeto de Propídio;
- Investigar o potencial de indução de apoptose pelos mesmos óleos essenciais, através da técnica de TUNEL;
- Avaliar os efeitos desses óleos essenciais sobre a produção de TGF- $\beta$ , através da técnica de ELISA.

## **3 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 Reagentes**

Meio de cultura RPMI 1640, meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), Aminoácidos não-essenciais, soro fetal bovino e *kit* APO-BrdU™ TUNEL foram adquiridos da Invitrogen. Dimetil sulfóxido (DMSO), iodeto de propídio, brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) e o eugenol foram adquiridos da Sigma Aldrich. O *kit* de ELISA BD OptEIA foi adquirido da BD Biosciences.

### **3.2 Coleta de material vegetal e extração de óleo essencial**

As folhas frescas de *Mentha x villosa* Huds. e de *Ocimum gratissimum* L. foram coletadas no mês de janeiro/2012 no horto da faculdade de farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG. As folhas foram colocadas em um balão de 12 litros com água destilada, foram submetidas a hidrodestilação com aparato Clavenger modificado por uma hora e 30 minutos contados a partir do início da ebulição. Após a eliminação do hidrolato o óleo essencial foi coletado em frascos higienizados e mantidos em freezer a -80°C até sua utilização.

### **3.3 Identificação dos componentes dos óleos essenciais**

As amostras dos óleos essenciais foram analisadas na Plataforma Analítica da Farmanguinhos (FIOCRUZ – Rio de Janeiro, RJ) em cromatógrafo gasoso equipado com coluna capilar de sílica fundida (HP-5, 30 m × 0.25 mm, 0.25 µm espessura do filme). Hélio foi utilizado como gás carreador, com taxa de fluxo de 1 mL/min e temperatura programada de 70°C a 290°C (2°C/min). A cromatografia foi realizada em conjunto com a espectrometria de massa, em espectrômetro acoplado Hewlett-Packard 5972 (HP – CA – Estados Unidos) configurado para 70eV, fonte de íons 250°C equipado com impacto de elétrons (EI). A identificação dos componentes foi realizada através de comparação de seus índices de retenção (calculado em função do tempo de saída da coluna do cromatógrafo) com aqueles obtidos na cromatografia gasosa de hidrocarbonetos alifáticos de 8 a 30 carbonos, realizada nas mesmas condições dos óleos essenciais. Os dados de tempo de retenção obtidos foram utilizados para o cálculo do índice de retenção de Kovats (IRcalc).

$$I = 100 \left[ n + (N - n) \frac{t_r(\text{amostra}) - t_r(n)}{t_r(N) - t_r(n)} \right]$$

Onde o índice de retenção (*I*) é calculado em função dos tamanhos dos alcanos utilizados (*N*=maior, *n*=menor), do tempo de retenção (*t<sub>r</sub>*) desses compostos e da amostra para a qual se deseja atribuir o índice.

Os resultados da espectrometria de massa e os índices de retenção foram comparados com aqueles dados armazenados no banco de dados Wiley 275.1, no banco de dados virtual PHEROBASE (2014) e com aqueles encontrados na literatura (ADAMS, 1995).

### **3.4 Obtenção de macrófagos intraperitoneais**

Os macrófagos foram obtidos de camundongos Balb/c fêmeas, através de procedimentos aprovados pelo CEUA da UFJF sob o protocolo 020/2013. Foram injetados, intraperitonealmente, 2mL de solução de meio de tioglicolato a 5%. Após 72 horas, os animais foram eutanasiados com dose letal de 10mg/kg xilasina e 150mg/kg cetamina, e, imediatamente após, receberam 5 mL de injeção intraperitoneal de tampão fosfato salino (PBS) gelado, que foi aspirado após a lavagem para a coleta dos macrófagos. As células foram centrifugadas a 1300 rpm por 10 minutos, e ressuspensas em meio RPMI-1640 suplementado (2 mM L-glutamina, 100 µg/mL de estreptomicina e penicilina, 5% de soro fetal bovino), sendo este protocolo adaptado de ZHANG *et al.* (2008). P

### **3.5 Cultura de Células**

A linhagem de monocítica de sarcoma murino J774 A.1, derivada de tumor de camundongos Balb/c, foi mantida em meio RPMI-1640 suplementado (2 mM L-glutamina, 100 µg/mL de estreptomicina e penicilina, 5% de soro fetal bovino). A linhagem de células tumorais de pulmão A549 foi mantida em meio DMEM suplementado (2 mM L-glutamina, 100 µg/mL de estreptomicina e penicilina, 10% de soro fetal bovino). As duas linhagens de células foram incubadas em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, sendo que para todos os experimentos foi respeitado um tempo mínimo de sete dias pós-descongelamento para adaptação das células. Durante esse período as células foram feitas a troca regular do meio de cultura e o

repique das células, através de remoção mecânica com raspador de células, quando a confluência era superior a 80%.

### 3.6 Ensaio de Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi determinada através de ensaio de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) adaptado de Mosmann (1983). O ensaio é baseado na capacidade de células vivas de converter MTT, de coloração amarelada, em cristais de formazan, de coloração violeta. A intensidade da coloração indica a viabilidade das células, e foi medida em espectrômetro (Spectramax 190; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA). As linhagens de células foram distribuídas em placas de 96 poços em uma concentração de  $2 \times 10^5$  células/mL. Os macrófagos intraperitoneais foram utilizados em uma concentração maior,  $2 \times 10^6$  células/mL. Os óleos essenciais foram diluídos em dimetil sulfóxido (DMSO) e no meio de cultura adequado para cada linhagem celular até que o diluente atingisse a concentração de 4%. Como o volume de tratamento colocado em cada poço foi de 20  $\mu$ L de um volume total de 200  $\mu$ L por poço, a concentração final de DMSO foi de 0,4%. Foram avaliadas sete diferentes concentrações dos óleos essenciais, 5; 10; 50; 100; 130; 160 e 200  $\mu$ g/mL, que foram escolhidas tendo como base as concentrações utilizadas normalmente em ensaios de citotoxicidade em linhagens tumorais, com óleos essenciais (DUYMUS et al., 2014; JIA-LIANG et al., 2013; CHEN et al., 2013). Com o intuito de comparar os efeitos do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* com seu composto majoritário, o eugenol, foram utilizadas concentrações de eugenol na mesma proporção encontrada nas sete concentrações de óleo essencial (com 91,43% de eugenol) avaliadas. As células foram incubadas por 48h, a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, com ou sem os tratamentos e DMSO na concentração de 0,4% foi utilizado como controle negativo, por ser a maior concentração do diluente encontrada nos tratamentos. As placas de cultura foram centrifugadas por dez minutos a 1300 rpm, o sobrenadante foi removido e acondicionado em freezer -20°C até a sua utilização para quantificação de TGF- $\beta$ 1. Posteriormente, as placas contendo as células receberam 100  $\mu$ L de meio de cultura adequado para cada célula (DMEM – A549 / RPMI – J774 A.1 e Macrófagos Intraperitoneais) por poço, onde também foram adicionados 10  $\mu$ L de MTT (5 mg/mL). As células foram incubadas novamente por 4h e ao final desse período as células foram novamente centrifugadas, os sobrenadantes removidos e a diluição dos cristais de formazan feita em DMSO 98%,

a absorbância foi medida em espectrofotômetro (Spectramax 190; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) em comprimento de onda de 540 nm. A análise da sobrevivência relativa ou percentual de sobrevivência foi calculada segundo a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de células viáveis} = \frac{\text{Absorbância da Amostra}}{\text{Absorbância média do controle}} \times 100$$

O IC50, concentração necessário do tratamento para reduzir a viabilidade celular a 50%, foi obtido através de regressão linear dos dados obtidos no ensaio de MTT.

### **3.7 Análise de ciclo celular em marcação com iodeto de propídio**

O iodeto de propídio (PI) é um fluorocromo capaz de marcar DNA. A marcação com PI proporciona a medida do percentual de células em cada fase do ciclo celular (G1/S/G2), e por isso tem sido utilizada na verificação de possíveis arrastes ou acúmulos anormais de células em determinada fase ciclo celular (LOOS *et al.* 2014; TRAN *et al.* 2014). Outro dado fornecido por essa marcação é a medida de fragmentação de DNA, que reflete a quantidade de células apoptóticas na amostra. A quantificação é realizada por citometria de fluxo, caso haja fragmentação de DNA são visualizados picos que indicam quantidade de DNA sub-diplóide, também conhecido como SubG1 (RICCARDI e NICOLETTI, 2006). As células foram cultivadas em placas de 24 poços em concentração final de  $2 \times 10^5$  células/mL e tratadas com 200, 100, 50  $\mu\text{g/mL}$  dos óleos essenciais, ou então com 0,4% de DMSO no caso dos controles. As concentrações foram escolhidas tendo como base os resultados do ensaio de MTT. Para avaliação de DNA subdiplóide (SubG1) foram representados os resultados de 200  $\mu\text{g/mL}$ , tratamento capaz de reduzir drasticamente a viabilidade. Para a avaliação de alterações no ciclo celular foram utilizadas as concentrações de 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ , onde a viabilidade ainda não apresentava grande redução. Após 1, 24 e 48 horas de tratamento as placas foram centrifugadas por 10 min a 1200 rpm e o precipitado foi ressuspenso em 300  $\mu\text{L}$  de solução gelada de marcação de iodeto de propídio (0,05% iodeto de propídeo, 1% citrato de sódio, 0,5% triton X 100). A placa foi incubada ao abrigo de luz por 4 horas a 4°C ao abrigo de luz até a leitura das amostras em citômetro BD FACSCalibur. As análises dos histogramas foram realizadas no *software* FCS express.

### **3.8 Método de TUNEL**

O ensaio ou método de TUNEL (Terminal Deoxynucleotide Transferase dUTP Nick End Labeling) tem sido utilizado recentemente para obter medidas de apoptose tanto em tecidos tumorais como em culturas de linhagens de células tumorais (DE LAS LLAGAS, SANTIAGO e RAMOS, 2014; LI *et al*, 2014). O ensaio consiste da marcação das quebras de DNA provocadas por endonucleases, com um nucleotídeo desoxiuridina trifosfato (dUTP) marcado. Esses nucleotídeos então são detectados com uma sonda específica (ELMORE 2007). As células utilizadas neste ensaio foram tratadas da mesma forma que as células utilizadas para análise com iodeto de propídio (Item 3.7), por 24 e 48 horas. Para esse ensaio foram analisadas as concentrações e tratamentos que foram capazes de induzir acúmulo de células com quantidade de DNA sub-diplóide (SubG1), visto que esse parâmetro é um indicativo de fragmentação do DNA. Neste estudo foi utilizado o *kit* “APO-BrdU™ TUNEL Assay Kit” e os procedimentos foram realizados de acordo com as indicações do fabricante. Após o término do tratamento, para fixação das células foi feita lavagem das células em tampão fosfato-salino (PBS 1X) gelado, seguida de fixação em paraformaldeído 1% e posteriormente em etanol 70%. Em seguida foi realizada a marcação com o *kit* supracitado.

### **3.9 Dosagem de TGF-β1 no sobrenadante de cultura de células A549**

O sobrenadante retirado das placas onde foi realizado o ensaio de MTT (Item 2.5), e armazenado a -20°C, foi avaliado quanto a concentração de TGF-β1, citocina constitutivamente produzida por células A549 (KWONG *et al*. 2004) e cuja sinalização é importante na manutenção da viabilidade dessas células (XU *et al.*, 2011). Foram avaliadas as concentrações de 130, 100, 50, 10 e 5 µg/mL dos tratamentos com os óleos essenciais. As concentrações de 160 e 200 µg/mL não foram avaliadas devido a baixa viabilidade apresentada por células tratadas com essas concentrações dos óleos essenciais. Nesse caso poderia haver menor produção da citocina devido à menor quantidade de células viáveis capazes de produzi-la, não refletindo a ação do tratamento sobre a produção da mesma. A detecção foi realizada através de ensaio imuno-adsorvente ligado à enzima (ELISA / Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), o qual foi realizado de acordo com as instruções do fabricante (BD Biosciences – CA – Estados Unidos).

### **3.10 Análise estatística**

Os dados são apresentados como média seguida de desvio padrão de experimentos realizados com cinco (Ensaio de MTT e ELISA) ou três repetições (Análise de ciclo celular – PI e TUNEL). Os resultados foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Os dados que apresentaram distribuição normal foram analisados por ANOVA/Bonferroni e aqueles que não apresentaram distribuição normal foram submetidos ao teste de Kruskal–Wallis/Mann–Whitney. Os testes foram realizados no *software* GraphPad Prism 5.00 e foram consideradas diferenças significativas aquelas com valores de  $P < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Composição dos óleos essenciais

A Tabela 1 mostra os dados referentes as análises de cromatografia gasosa e espectrometria de massa (GC-MS) que indicaram uma grande quantidade de eugenol (91,43%) no óleo essencial de *Ocimum gratissimum*, sendo que o segundo componente mais abundante, germacreno-D, foi inferior a 10%. Outros autores já demonstraram que o eugenol é o componente majoritário dessa espécie, porém nestes trabalhos as concentrações encontradas variam em torno de 70%(SILVA *et al.* 2012; PAULA-FREIRE *et al.*, 2013). Essas variações nas concentrações dos componentes do óleo essencial podem ocorrer tanto pela variedade da planta, quanto pela época de colheita das folhas (FREIRE, MARQUES e COSTA, 2006; VIEIRA *et al.* 2001).

A Tabela 1 também mostra que o óleo essencial de *Mentha x villosa* foi caracterizado pela predominância do óxido de piperitenona (70,88%), concentração semelhante àquelas encontradas em outros trabalhos (LIMA *et al.*, 2014; TELES *et al.* 2013). O segundo componente mais abundante, que neste extrato também foi o germacreno D, que não ultrapassou os 10% de concentração.

Tabela 1 – Composição dos óleos essenciais de *Ocimum gratissimum* L. (OEOG) e *Mentha x villosa* Huds.(OEMV). Esses dados foram obtidos através de cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massa (GC/MS). Estão representados o tempo de retenção (RT), índices de retenção calculados (IRcalc) e registrados na literatura (IRlit),

	Composição (%)	RT	IRcalc	IR lit
<b>OEOG</b>				
Eugenol	91,43	15,470	1350	1356
Trans-cariofileno	0,98	17,216	1418	1418
Iso-eugenol	1,09	18,189	1457	1451
Germacreno-D	6,50	18,724	1478	1480
<b>OEMV</b>				
Terpinen-4-ol	3,02	10,946	1177	1177
Eugenol	1,40	15,389	1347	1356
Óxido de piperitenona	70,88	15,723	1359	1363
cis-jasmona	1,77	16,421	1386	1394
trans-cariofileno	1,56	17,209	1417	1418
$\beta$ -farneseno	6,48	17,840	1443	1458
Germacreno-D	9,46	18,732	1478	1480
Delta-cadineno	0,95	19,556	1512	1524
1,6-Germacradien-5-ol	1,08	21,012	1573	1574
$\alpha$ -cadinol	1,42	22,18	1623	1653
Eudesm-7(11)-en-4-ol	1,98	23,731	1692	1691

#### **4.2 Efeito de OEOG e OEMV sobre a viabilidade das linhagens J774 A.1 e A549**

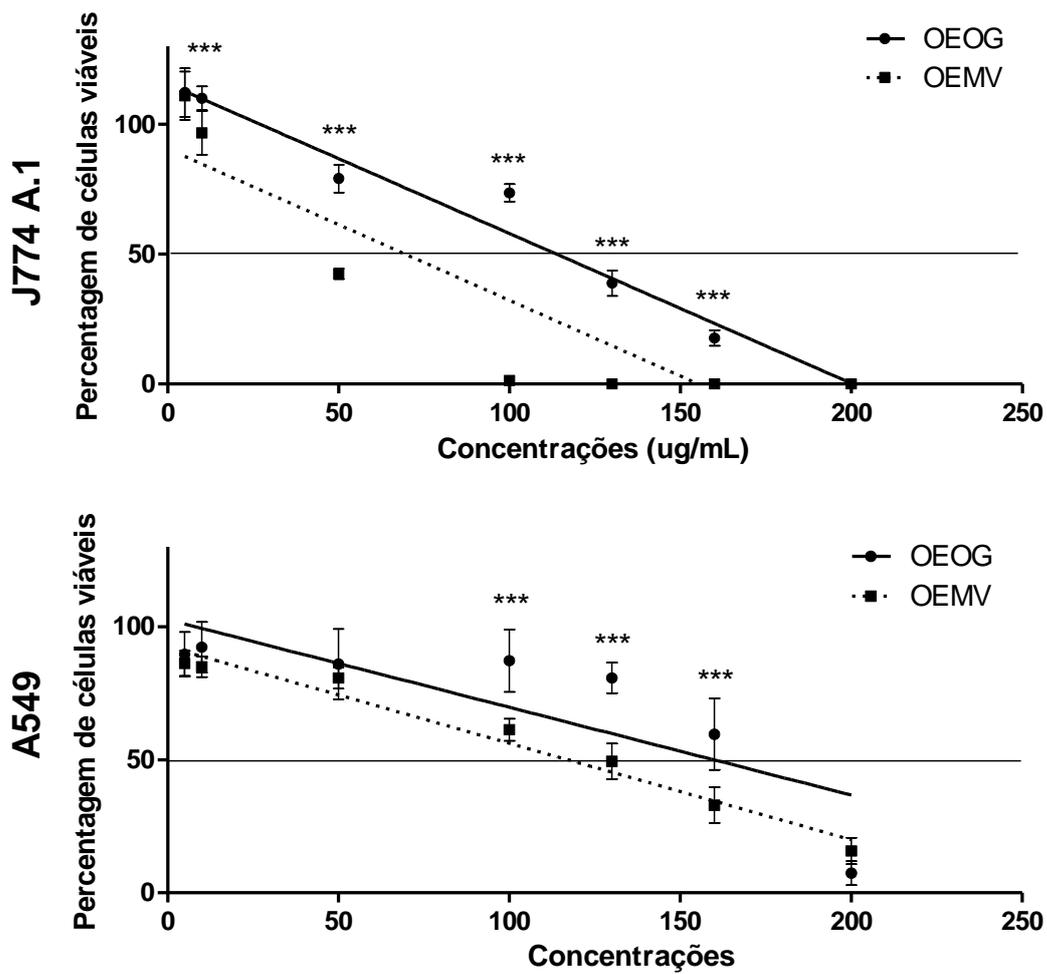
O ensaio de MTT foi realizado com as linhagens de células J774 A.1 e A549 tratadas com ambos os óleos essenciais (OEOG e OEMV). Após 48 horas de cultura, dois tratamentos foram capazes de reduzir a viabilidade celular de forma dose dependente, sendo que os tratamentos onde a viabilidade foi inferior a 80% foram considerados citotóxicos (Tabela 2 / Figura 2).

As análises do IC50 indicaram que o OEMV apresentou maior citotoxicidade contra as células de câncer de pulmão não-pequenas A549 quando comparado com o OEOG, ou seja, OEMV apresentou IC50 menor (117 $\mu$ g/mL) que aquele do OEOG (160  $\mu$ g/mL). O tratamento com OEOG só foi capaz de reduzir a viabilidade para valores menores que 80% nas duas maiores concentrações 160 e 200 $\mu$ g/mL, enquanto a concentração de 100  $\mu$ g/mL de OEMV foi citotóxica

Os valores de IC50 das células J774 A.1 foram menores que aqueles obtidos nas células A549, indicando uma maior toxicidade para aquelas células. Porém ao analisar as duas menores concentrações (5 e 10  $\mu$ g/mL), os óleos essenciais causaram redução de viabilidade nas células A549, enquanto as células J774 A.1 não apresentaram redução de viabilidade, nessas concentrações.

**Tabela 2** – Avaliação da viabilidade das linhagens J774 A.1 e A549 tratadas com OEOG e OEMV. A concentração de óleo essencial necessária para reduzir a viabilidade a 50% (IC50) foi obtida através de regressão linear.

Concentração ( $\mu\text{g/ml}$ )	J774 A.1		A549	
	OEOG	OEMV	OEOG	OEMV
5	100 $\pm$ 9,3	100 $\pm$ 9,4	89,7 $\pm$ 8,3	86,2 $\pm$ 4,7
10	100 $\pm$ 4,6	96,7 $\pm$ 8,5	92,3 $\pm$ 9,4	85,0 $\pm$ 4,0
50	79,1 $\pm$ 5,4	42,4 $\pm$ 2,1	85,9 $\pm$ 13,2	80,7 $\pm$ 4,0
100	73,6 $\pm$ 3,4	1,4 $\pm$ 1,0	87,3 $\pm$ 11,7	61,3 $\pm$ 4,2
130	38,8 $\pm$ 4,9	0,0 $\pm$ 0,1	80,8 $\pm$ 5,8	49,9 $\pm$ 6,7
160	17,7 $\pm$ 3,1	0,0 $\pm$ 0,2	59,6 $\pm$ 3,5	33,0 $\pm$ 6,7
200	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	7,4 $\pm$ 4,5	15,7 $\pm$ 5,0
IC50 ( $\mu\text{g/ml}$ )	113	69	160	117



**Figura 2** – Avaliação da viabilidade das linhagens J774 A.1 e A549 tratadas com OEOG e OEMV. A concentração de óleo essencial necessária para reduzir a viabilidade a 50% (IC50) foi obtida através de regressão linear. \*\*\*  $p < 0,001$  na comparação entre os óleos essenciais.

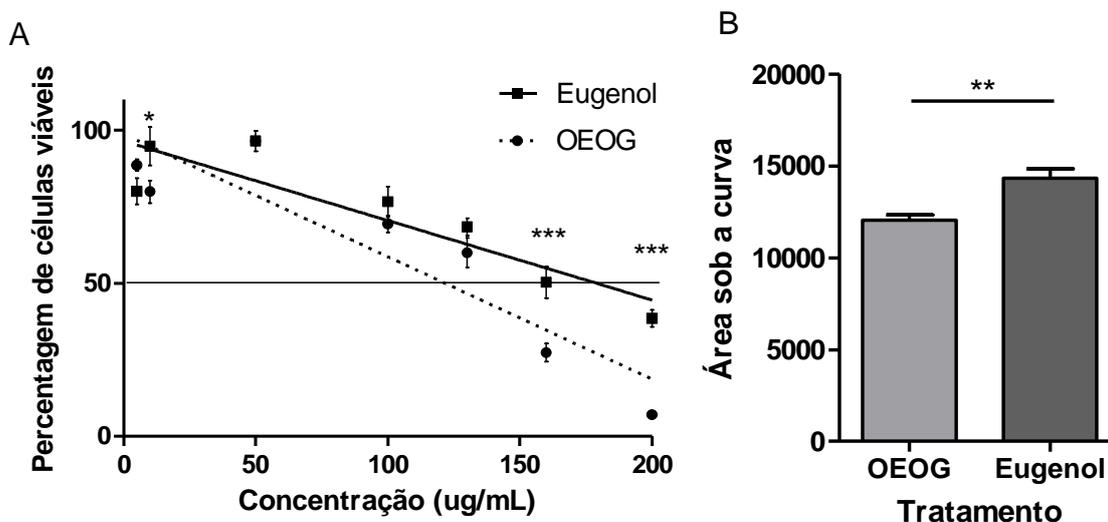
### **4.3 Efeito do Eugenol na viabilidade da linhagem de células A549**

O ensaio de MTT foi realizado simultaneamente com células (A549) tratadas com OEOG e com Eugenol, seu composto majoritário. Foi visto que, após 48h, ambos os tratamentos foram capazes de reduzir a viabilidade, numa resposta dose-dependente. Contudo, foi observado um IC50 mais elevado para o tratamento com eugenol (179,52  $\mu\text{g/mL}$ ) quando comparado com o OEOG (121,02  $\mu\text{g/mL}$ ). Esses resultados indicam uma ação sinérgica entre os componentes do OEOG, que tornam o óleo essencial mais eficiente que seu composto majoritário isolado. (Tabela 3 / Figura 3)

Essa maior eficiência pode ser observada pela avaliação da área sob a curva, que demonstra a maior viabilidade das células tratadas com o Eugenol isolado em comparação com o OEOG.

**Tabela 3** – Viabilidade de células da linhagem A549 tratadas com OEOG e Eugenol. Estão representadas as médias dos percentuais de viabilidade, em relação ao controle, seguidas de desvio padrão.

Concentração (mg/mL)	OEOG	Eugenol
5	88,63 ± 4,33	80,06 ± 9,60
10	79,96 ± 8,26	94,74 ± 14,02
50	96,39 ± 2,43	96,45 ± 7,53
100	69,42 ± 6,05	76,67 ± 11,14
130	60,01 ± 10,80	68,43 ± 6,43
160	27,36 ± 6,62	50,34 ± 11,40
200	7,07 ± 0,67	38,59 ± 6,21
IC50	121,02	179,52



**Figura 3** – Viabilidade de células A549 tratadas com OEOG ou com Eugenol. A viabilidade foi determinada através do ensaio de MTT após 48h de tratamento. (A) A concentração de óleo essencial necessária para reduzir a viabilidade a 50% (IC50) foi obtida através de regressão linear. (B) Comparação da eficiência dos tratamentos através da área sob a curva (B). \*\*\* p<0,001; \*\* p<0,1; \*p<0,05 na comparação entre os tratamentos.

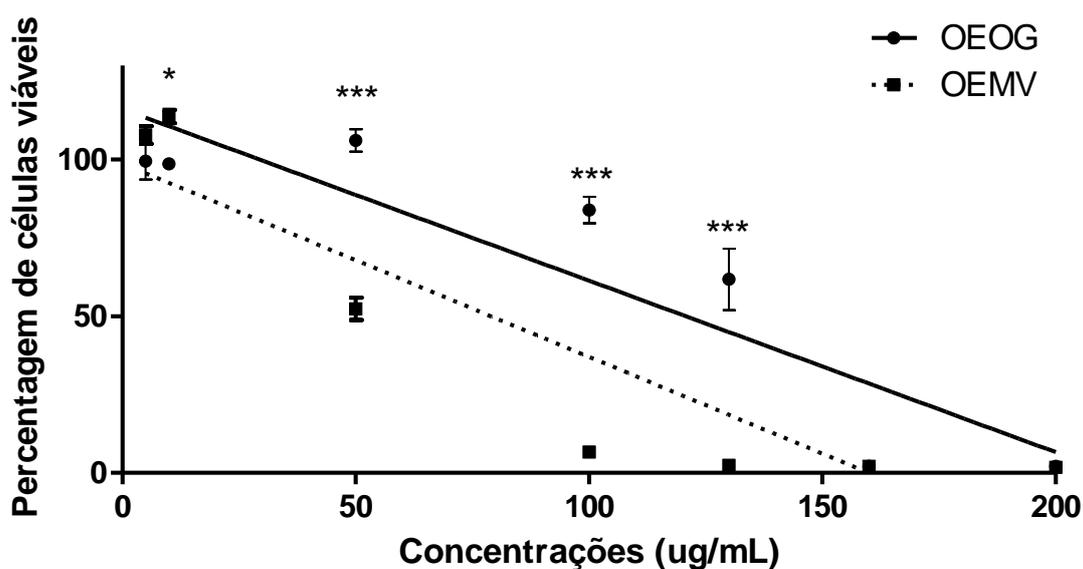
#### **4.4 Efeitos de OEOG e OEMV sobre a viabilidade de macrófagos primários**

Foi avaliada a viabilidade de macrófagos intraperitoneais, retirados de camundongos Balb/c Fêmeas após recrutamento com tioglicolato. O ensaio de MTT indicou perda de viabilidade no tratamento com ambos os óleos essenciais. Contudo, a concentração de 10  $\mu\text{g/mL}$ , tóxica para linhagens tumorais, não afetou a sobrevivência dessas células (Tabela 4 / Figura 4)

O IC50 obtido no tratamento dos macrófagos primários foi inferior àqueles relatados nos tratamentos das linhagens tumorais, indicando uma maior toxicidade do tratamento para células não tumorais. As concentrações de OEMV iguais a 100  $\mu\text{g/mL}$  e superiores a ela eliminaram por completo as células primárias viáveis. O IC50 do tratamento com OEMV (78,13  $\mu\text{g/mL}$ ) foi inferior ao apresentado pelo tratamento OEOG (119,08  $\mu\text{g/mL}$ ), em concordância com os resultados obtidos nas demais células avaliadas.

**Tabela 4** – Viabilidade de macrófagos intraperitoneais tratados com OEOG e OEMV. Estão representadas as médias dos percentuais de viabilidade, em relação ao controle, seguidas de desvio padrão.

Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	OEOG	OEMV
5	99,54 $\pm$ 13,23	107,84 $\pm$ 6,24
10	98,61 $\pm$ 3,02	113,76 $\pm$ 4,76
50	106,16 $\pm$ 8,01	52,39 $\pm$ 7,99
100	83,88 $\pm$ 9,47	6,67 $\pm$ 2,17
130	61,79 $\pm$ 21,90	2,45 $\pm$ 0,69
160	2,11 $\pm$ 0,49	2,13 $\pm$ 0,44
200	2,15 $\pm$ 0,87	1,74 $\pm$ 0,35
IC50	119,08	78,13



**Figura 4** – Avaliação da viabilidade celular de macrófagos intraperitoneais tratados com OEOG e OEMV. A viabilidade celular foi avaliada através do ensaio de MTT. A concentração de óleo essencial necessária para reduzir a viabilidade a 50% (IC50) foi obtida através de regressão linear. \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*  $p < 0,05$  na comparação entre os tratamentos.

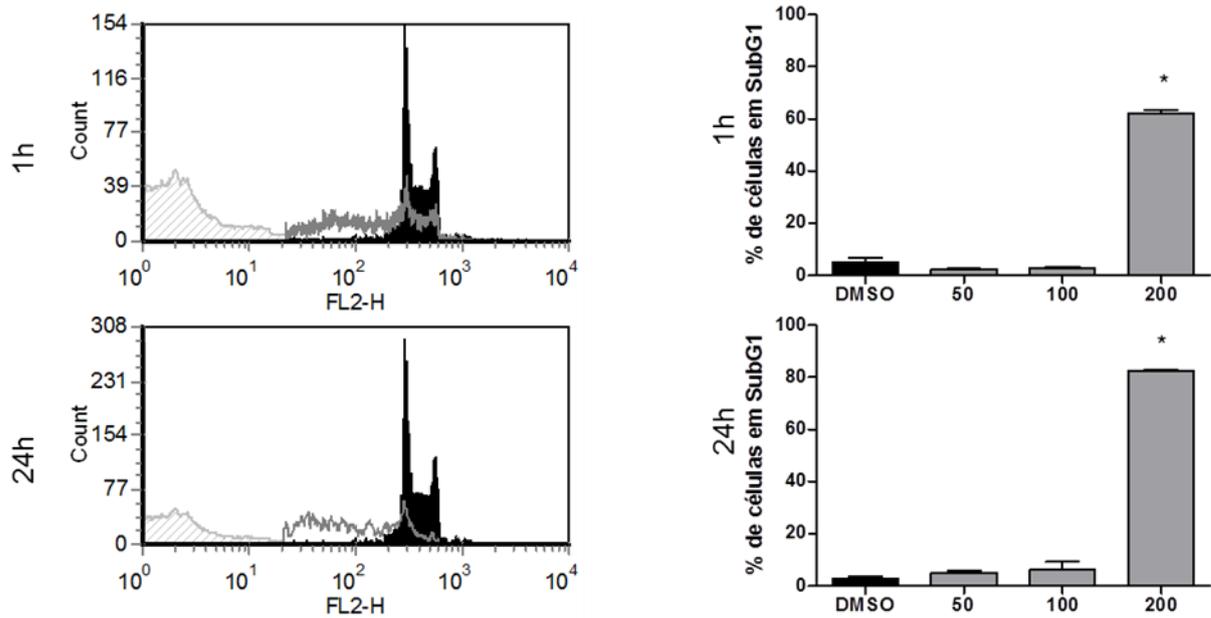
#### 4.5 Avaliação da fragmentação de DNA

A fragmentação do DNA é uma das características da morte celular por apoptose, que pode ser avaliada através da quantificação de células permeabilizadas com DNA subdiploide (SubG1), através de citometria de fluxo com marcação de iodeto de propídio. Os eventos com DNA subdiploide são indicados por picos abaixo da marcação da fase G1 (DARZYNKIEWICZ *et al.* 1997; KAJSTURA *et al.* 2007).

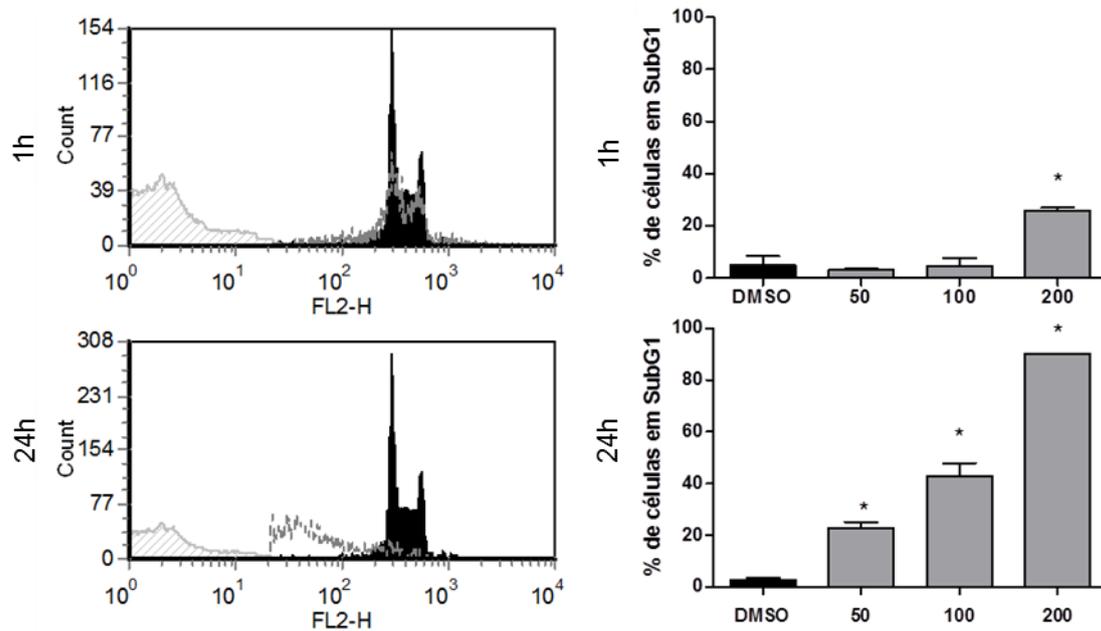
As células J774 A.1 tratadas com OEOG apresentaram aumento da fase SubG1 na primeira hora de tratamento na concentração de 200 µg/mL, o tratamento com OEMV na mesma concentração também induziu esse aumento porém em uma intensidade menor (Figura 5).

Após 24 horas de tratamento as menores concentrações de OEMV (50 e 100 µg/mL) também induziram esse aumento de eventos com quantidade subdiploide de DNA, o que não ocorreu para os tratamentos com o OEOG, onde mesmo depois de 24 horas de tratamento somente a maior concentração levou ao aumento da fase SubG1 (Figura 6).

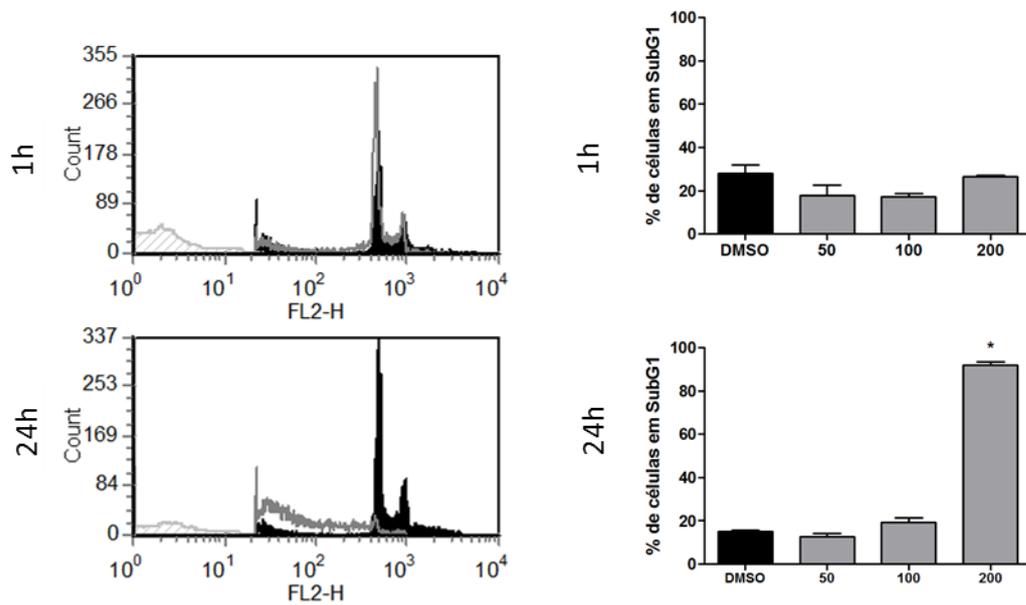
Na primeira hora de tratamento das células A549 nenhum dos óleos essenciais foram capazes de aumentar a ocorrência de eventos em SubG1, efeito que ocorreu somente após as 24 horas de tratamento tratamento com OEOG (Figura 7). Enquanto o tratamento com OEMV induziu o mesmo efeito com menor intensidade, também com 24h de tratamento, e alcançou os 90% de DNA subdiploide após 48h de tratamento (Figura 8)



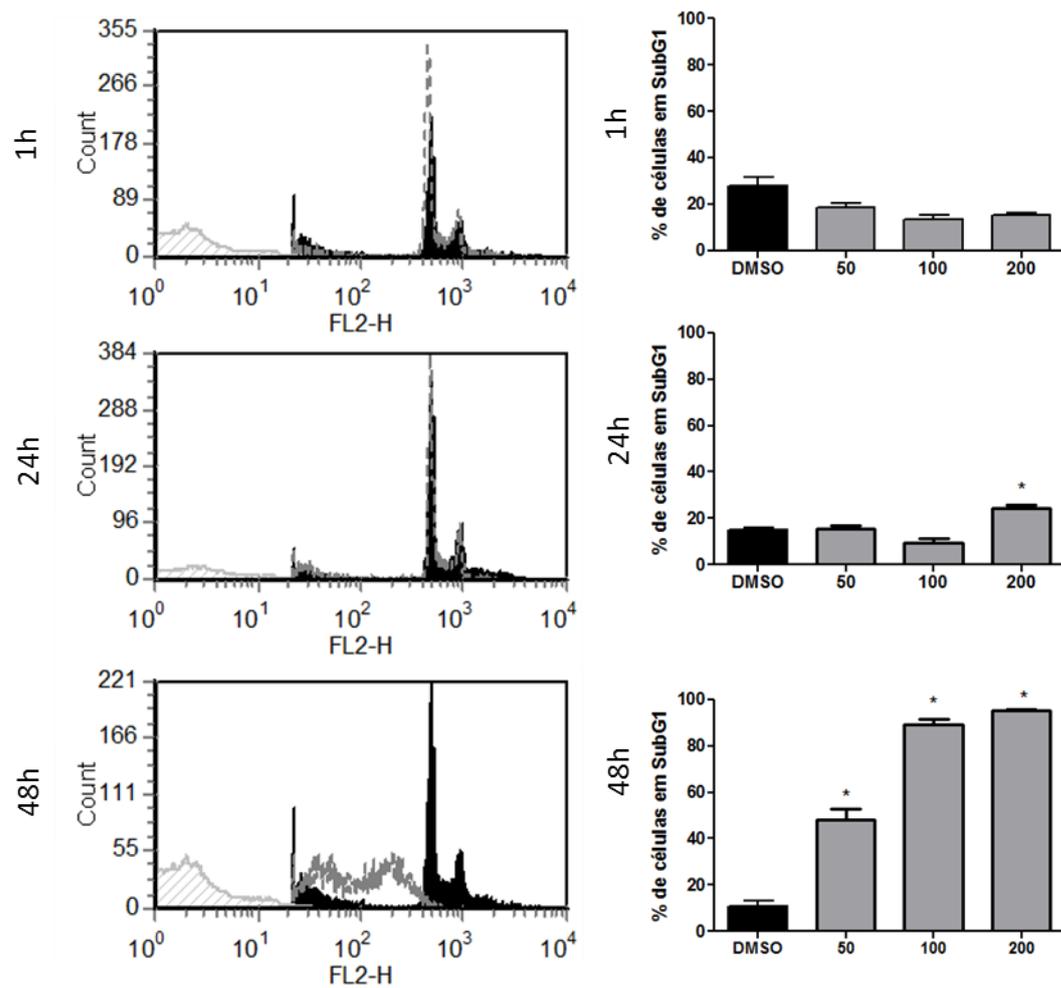
**Figura 5** – Análise da fragmentação de DNA em células da linhagem J774 A.1 tratadas com OEOG. A marcação com iodeto de propídio e a citometria de fluxo foram realizadas 1 e 24 horas após o tratamento. Foi utilizado 0,4% de DMSO como controle. O tratamento com os óleos essenciais é representado no histogramama pela linha cinza, histograma não preenchido e o controle pela linha preta, histograma preenchido (concentração de 200μg/mL). Gráficos de barras representam a percentagem de eventos em SubG1 após o tratamento com OEOG. \*  $p < 0,05$  quando comparado com o controle.



**Figura 6** – Análise da fragmentação de DNA em células da linhagem J774 A.1 tratadas com OEMV. A marcação com iodeto de propídio e a citometria de fluxo foram realizadas 1 e 24 horas após o tratamento. Foi utilizado 0,4% de DMSO como controle. O tratamento com os óleos essenciais é representado no histogramama pela linha cinza, histograma não preenchido e o controle pela linha preta, histograma preenchido (concentração de 200µg/mL). Gráficos de barras representam a percentagem de eventos em SubG1 após o tratamento com OEMV. \*  $p < 0,05$  quando comparado com o controle.



**Figura 7** – Análise da fragmentação de DNA em células da linhagem A549 tratadas com OEOG. A marcação com iodeto de propídio e a citometria de fluxo foram realizadas 1 e 24 horas após o tratamento. Foi utilizado 0,4% de DMSO como controle. O tratamento com os óleos essenciais é representado no histogramama pela linha cinza, histograma não preenchido e o controle pela linha preta, histograma preenchido (concentração de 200µg/mL). Gráficos de barras representam a percentagem de eventos em SubG1 após o tratamento com OEOG. \*  $p < 0,05$  quando comparado com o controle.



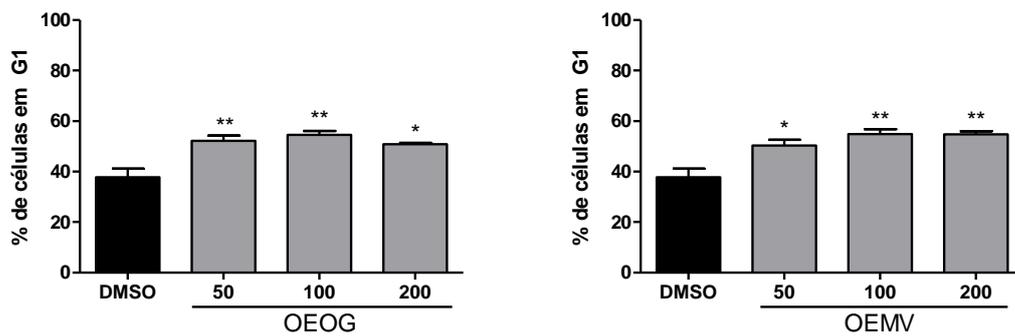
**Figura 8** – Análise da fragmentação de DNA em células da linhagem A549 tratadas com OEMV. A marcação com iodeto de propídio e a citometria de fluxo foram realizadas 1, 24 e 48 horas após o tratamento. Foi utilizado 0,4% de DMSO como controle. O tratamento com os óleos essenciais é representado no histogramama pela linha cinza, histoograma não preenchido e o controle pela linha preta, histograma preenchido(concentração de 200µg/mL). Gráficos de barras representam a percentagem de eventos em SubG1 após o tratamento com OEMV. \*  $p < 0,05$  quando comparado com o controle.

#### **4.6 Ciclo celular**

Todas as concentrações avaliadas de ambos os óleos essenciais levaram ao acúmulo de células A549 na fase G1, na primeira hora de tratamento. Provavelmente, o acúmulo de células em G1 foi ocasionado pela diminuição da transição de células da fase G1 para S (Figura 9).

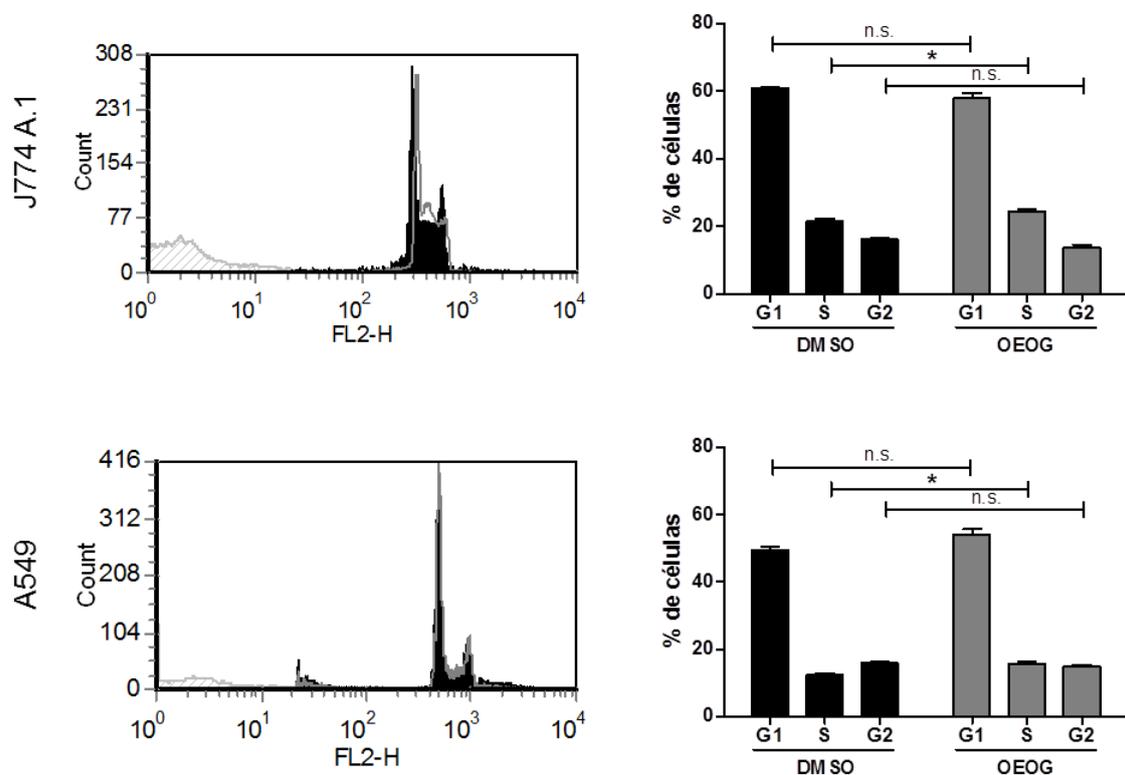
O tratamento por 24 com 50 µg/mL de OEOG induziu arraste na fase S nas duas linhagens celulares avaliadas. Enquanto não houve diferença significativa em comparação com o controle nas demais fases do ciclo celular (G1 e G2). (figura 10)

As alterações de ciclo celular observadas durante o tratamento com OEMV por 24h foram diferentes entre as duas linhagens de células. Este óleo essencial ocasionou arraste nas fases S e G2 nas células da linhagem A549, enquanto o percentual de células em G1 diminuiu. Nas células da linhagem J774 A.1 houve a diminuição das células em G1 e aumento das células em G2, contudo não foi observado arraste na fase S. (figura 11)



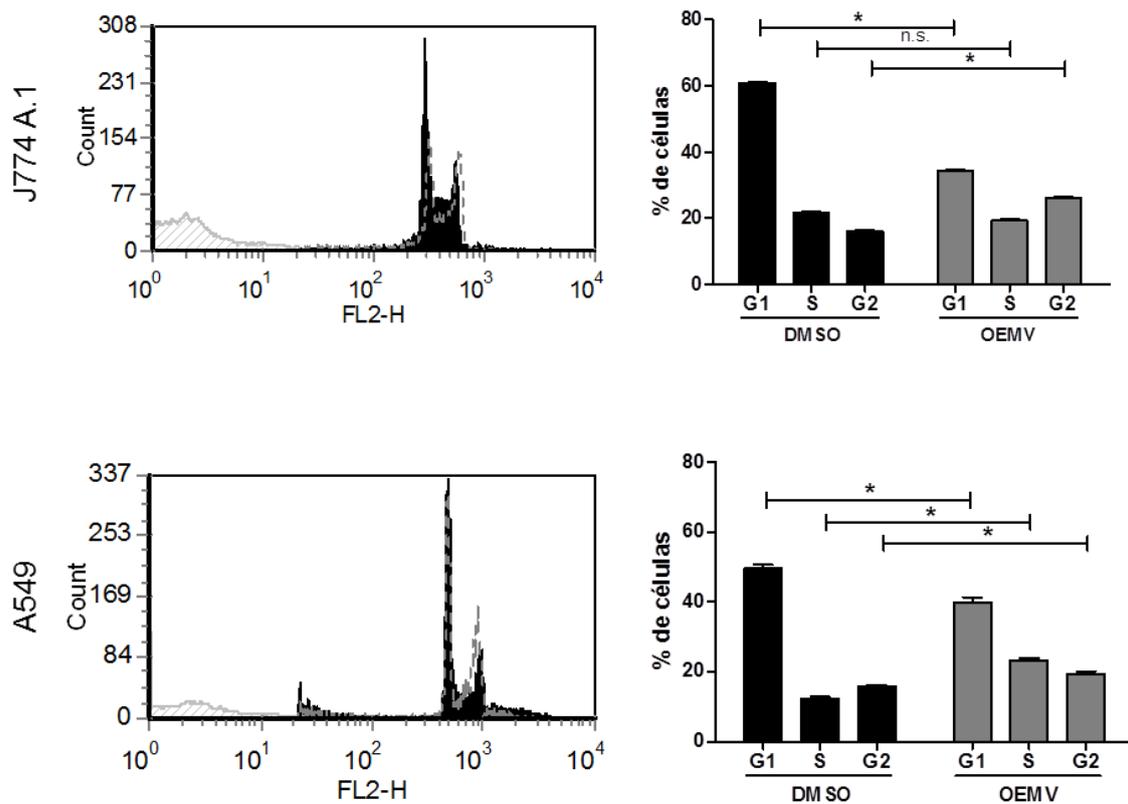
**Figura 9** - Análise do ciclo celular em células das linhagens A549 tratadas com OEOG e OEMV, quantificação de células em fase G1. A marcação com iodeto de propídio e a análise por citometria de fluxo foram realizadas 1 hora após o tratamento. Foi utilizado 0,4% de DMSO como controle. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,1$  quando comparado com o controle.

## OEOG



**Figura 10** – Análise do ciclo celular em células das linhagens A549 e J774 A.1 tratadas com 50  $\mu\text{g/mL}$  de OEOG. A marcação com iodeto de propídio e a análise por citometria de fluxo foram realizadas após 24 horas de tratamento. Foi utilizado 0,4% de DMSO como controle. O tratamento com os óleos essenciais é representado no histograma pela linha cinza, histograma não preenchido e o controle pela linha preta, histograma preenchido. Gráficos de barras representam a percentagem de eventos nas fases G1, S e G2. \*  $p < 0,05$  quando comparado com o controle.

## OEMV

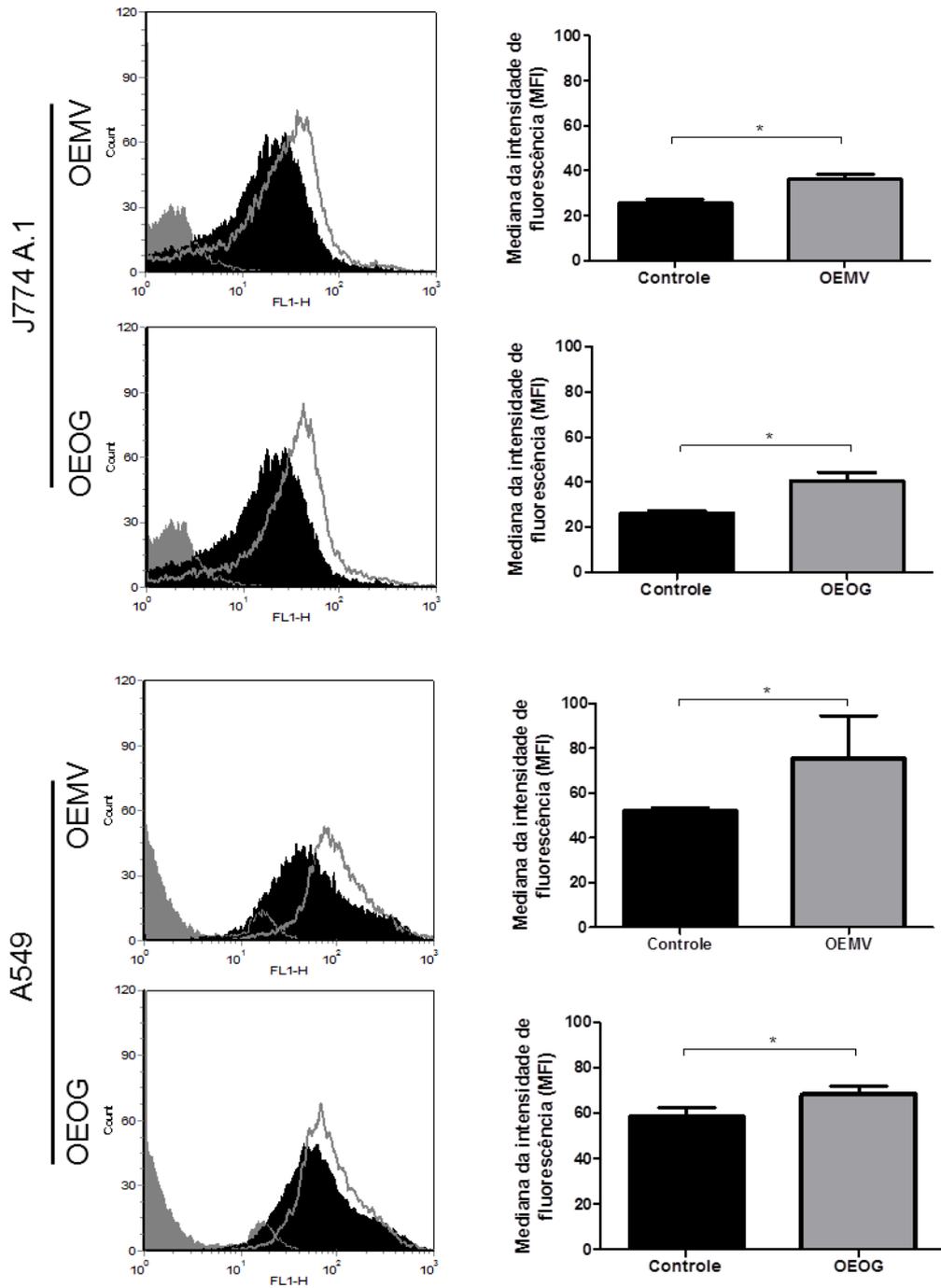


**Figura 11** – Análise do ciclo celular em células das linhagens A549 e J774 A.1 tratadas com 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de OEMV. A marcação com iodeto de propídio e a análise por citometria de fluxo foram realizadas após 24 horas de tratamento. Foi utilizado 0,4% de DMSO como controle. O tratamento com os óleos essenciais é representado no histograma pela linha cinza, histograma não preenchido e o controle pela linha preta, histograma preenchido. Gráficos de barras representam a percentagem de eventos nas fases G1, S e G2. \*  $p < 0,05$  quando comparado com o controle.

#### **4.7 Avaliação de apoptose através do ensaio de TUNEL**

O ensaio de TUNEL (Terminal Deoxynucleotide Transferase dUTP Nick End Labeling) é uma outra forma de se obter dados de fragmentação de DNA. Células tratadas nas mesmas concentrações e tempos em que a marcação de iodeto de propídio indicava apoptose, por acúmulo de células em SubG1, foram submetidos ao ensaio de TUNEL para confirmação deste resultado. Células J774 A.1 tratadas com 100 µg/mL de OEOG ou com 200 µg/mL de OEMV, por 24 horas. Células A549 tratadas nas mesmas concentrações, porém para o tratamento com OEMV foi utilizado o tempo de 48 horas. (Figura 12)

Em todos esses tratamentos, a comparação com o controle tratado com DMSO a 0,4% revelou aumento da média de intensidade da fluorescência, indicando aumento de células com fragmentação de DNA e conseqüentemente em processo de apoptose.



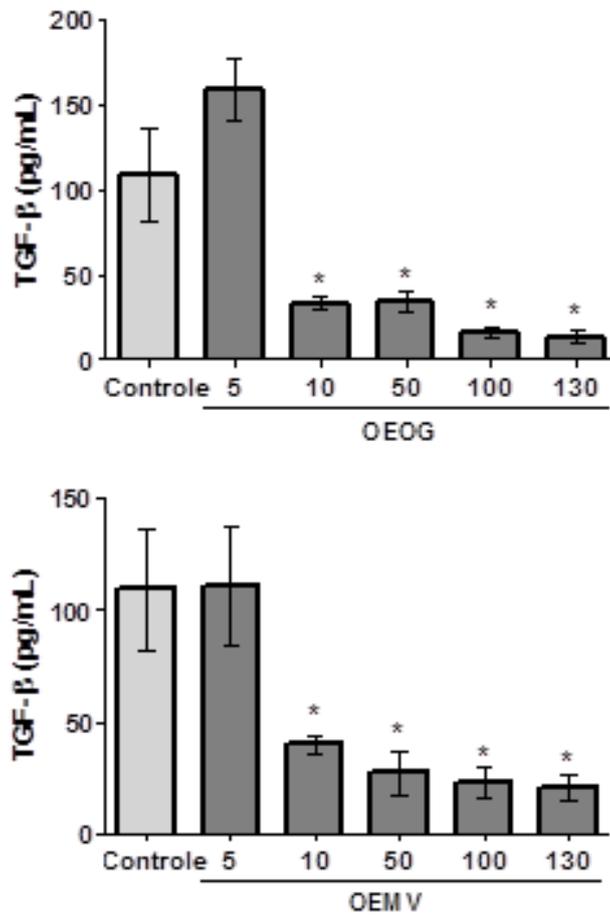
**Figura 12** – Análise de apoptose através da técnica de TUNEL em células das linhagens A549 e J774 A.1 tratadas com OEMV e OEOG. Células foram tratadas com 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de OEOG por 24 horas e 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de OEMV por 48 horas. Em preto os histogramas representativos dos controles (0,4% DMSO), os histogramas em cinza e vazios são os representativos de seus respectivos tratamentos. \*  $p < 0,05$  quando comparado com o controle.

#### **4.8 Avaliação da produção de TGF- $\beta$ 1 nas células tratadas com OEOG e OEMV**

Tendo em vista a atividade citotóxica e de parada de ciclo celular dos óleos essenciais, e sabendo-se da importância da citocina TGF- $\beta$ 1 na regulação desses processos em células tumorais, foi avaliada a presença desta citocina no sobrenadante da linhagem A549.

As duas maiores concentrações testadas no ensaio de MTT não foram avaliadas quanto à produção de TGF- $\beta$ 1, visto nesse estágio a viabilidade das células era muito baixa, e qualquer resultado de redução de TGF- $\beta$ 1 no sobrenadante poderia ser atribuído à reduzida viabilidade das células e não à interferência na produção da citocina.

A partir da concentração de 10  $\mu$ g/mL todas as concentrações dos dois óleos essenciais avaliados levaram à redução de TGF- $\beta$ 1 no sobrenadante da cultura de células A549 tratadas durante 48 horas (Figura 10).



**Figura 13** – Avaliação dos níveis de TGF-β1 no sobrenadante de cultura de células A549 tratadas com OEMV e OEOG. 48h após o tratamento foram recolhidas amostras dos sobrenadantes da cultura de células da linhagem A549. Foi realizado ELISA para a quantificação da citocina. \*  $p < 0,05$  quando comparado com o controle.

## 5 DISCUSSÃO

Estudos anteriores, com eugenol e alguns análogos, já haviam demonstrado os efeitos citotóxicos deste composto, que é predominante no OEOG. (YOO *et al.* 2005; JAGANATHAN *et al.* 2011; GHOSH *et al.* 2005). Apesar dos efeitos citotóxicos do composto majoritário do OEMV, óxido de piperitenona, ainda não estarem bem estabelecidos, os resultados do ensaio de MTT neste trabalho revelaram que esse extrato foi eficiente em reduzir a viabilidade das células de câncer de pulmão não-pequenas (A549).

Além de ser capaz de reduzir a viabilidade das células A549, o tratamento com OEMV alcançou um IC50 reduzido em relação ao OEOG, ou seja, é capaz de reduzir a viabilidade celular em concentrações reduzidas. Esses resultados indicam a maior eficiência que OEMV, apresenta em relação ao OEOG, na redução da viabilidade de linhagens tumorais.

A avaliação da viabilidade de células primárias (macrófagos intraperitoneais), tratadas com os óleos essenciais, indicou a toxicidade dos mesmos. Contudo, é comum a ocorrência de toxicidade causada por quimioterápicos (CTCAE, 2006), mostrando ser importante o desenvolvimento de técnicas de entrega de drogas. Esses métodos utilizam características específicas dos tumores ou então algum procedimento que indique ao carreador da droga o local da entrega. Tanto drogas hidrofílicas como hidrofóbicas podem ser liberadas na região tumoral através da utilização de lipossomos termossensíveis associados à indução de aumento de temperatura na região do tumor, restringindo os efeitos tóxicos sistêmicos e aumentando a disponibilidade da droga (DICHEVA & KONING, 2014). O pH levemente acidificado dos tumores é uma das características utilizadas para aumentar a especificidade do carregamento de drogas. Drogas são associadas com compostos que adquirem capacidade adesiva em pH 6,8, mas não possuem essa propriedade em pH fisiológico (YU *et al.*, 2014).

O aumento do percentual de células com DNA subdiploide em células tumorais já havia sido avaliado, em células de câncer do cólon, neste mesmo trabalho também foi realizada a avaliação de fragmentação de DNA através da técnica de TUNEL, confirmando a capacidade do eugenol de induzir apoptose nessas células tumorais avaliadas (JAGANATHAN *et al.*, 2011).

Os resultados aqui apresentados indicam que o OEOG, rico em eugenol, avaliado neste estudo também é capaz de induzir a fragmentação de DNA. O OEMV também apresentou este efeito, porém foi necessário um tempo maior, 48 horas de exposição para alcançar um patamar de fragmentação de DNA semelhante àquele obtido com o OEOG na concentração de 200 µg/mL.

O câncer é uma desordem do ciclo celular, as células se multiplicam indefinidamente e independentemente de estímulos de crescimento, por isso muitos novos compostos e alternativas de tratamento tem como alvo o ciclo celular. Muitos desses tratamentos, sobretudo os de origem vegetal, têm como objetivo induzir algum tipo de arraste, ou seja, parada do ciclo celular em alguma de suas fases (LIU *et al.*, 2013; FERRAZ *et al.*, 2013).

Já havia sido relatado que o composto majoritário do OEOG, eugenol, é capaz de induzir arraste de ciclo celular na fase de síntese (fase-S) dependente da inibição de fatores de transcrição da família E2F em células de melanoma (GHOSH *et al.*, 2005). Em análise dos efeitos do eugenol sobre uma linhagem de melanoma humano foi visto que o arraste da fase S antecipa a ocorrência de apoptose (CHOI *et al.*, 2011).

A menor concentração do OEMV utilizada para análise de ciclo celular (50µg/mL) levou ao arraste de células A549, porém não apresentou esse efeito nas células J774 A.1. No entanto, o OEOG levou ao efeito de arraste na fase S em ambas as células. Portanto, é possível que o OEMV possua algum mecanismo diferencial de ação em relação ao OEOG, devido a sua indução do arraste em S somente nas células A549.

O fator transformador de crescimento beta (TGF-β) desempenha papéis contraditórios em células tumorais. Apesar desta citocina exercer função reguladora nas fases iniciais do tumor, em estágios mais avançados do tumor pode colaborar para seu crescimento e metastátese.(DERYNC *et al.*, 2001; LEBRUN, 2012).

As células A549 apresentam uma produção basal de TGF-β1, que não é alterada por estímulos inflamatórios (KWONG *et al.* 2003). O bloqueio das vias de sinalização por esta citocina leva essas células de adenocarcinoma de pulmão a perderem sua capacidade invasiva e entrarem em processo de apoptose (XU *et al.*, 2011). Logo, a redução de TGF-β1 no sobrenadante de células A549 tratadas com

os óleos essenciais revela um possível mecanismo de ação desses compostos, no sentido de aumentar a morte dessas células pela falta de TGF- $\beta$  disponível.

O efeito do eugenol sobre a produção de TGF- $\beta$  já foi avaliado em modelo de artrite induzida por colágeno, sendo que esse composto também inibiu a produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (GRESPLAN *et al.*, 2012). Em macrófagos alveolares suínos o tratamento com eugenol é capaz de induzir a produção de TGF- $\beta$ 1, em concentrações semelhantes às aquelas utilizadas neste estudo (LIU *et al.*, 2012). Esses estudos indicam que o eugenol pode apresentar diversas formas de ação sobre a produção de TGF- $\beta$ 1, dependendo da situação em que é utilizado.

O efeito do eugenol sobre células de câncer de pulmão não-pequenas ainda não havia sido avaliado, e os dados supracitados demonstram que o OEOG, rico em eugenol, é capaz de reduzir a produção de TGF- $\beta$ 1, e ainda que essa redução pode afetar a sobrevivência dessas células, tendo em vista que a sinalização de TGF- $\beta$ 1 é importante na sobrevivência dessas células.

Da mesma forma que o OEOG, o OEMV foi capaz de reduzir a produção de TGF- $\beta$ 1 nas células A549, porém ainda não há registros dos efeitos do óxido de piperitenona sobre a produção de TGF- $\beta$ 1. Portanto, as semelhanças entre os resultados do OEOG e o OEMV fornecem indícios de que esses compostos possam atuar de forma semelhante.

Mais estudos são necessários para esclarecer as implicações da utilização desses óleos essenciais e de seus componentes isolados na terapêutica do câncer. Para tal, são necessários testes mais específicos que possam avaliar a ação destes extratos no mecanismo de inibição de TGF- $\beta$ . É de grande importância avaliar o efeito das concentrações não tóxicas, que afetam a produção de TGF- $\beta$ 1, na ocorrência de transição epitélio mesenquimal (EMT).

Células de perfil mesenquimal apresentam maior motilidade e menor expressão de caderinas, por isso a quantificação dessas moléculas e ensaios de invasão e motilidade, que avaliam a capacidade de migração de células através de uma matriz gelatinosa, são boas alternativas a determinação de ocorrência de EMT (ZONG *et al.* 2014). Tratamentos que tenham a capacidade de inibir a EMT são importantes, pois células tumorais, que passaram por esse processo, são resistentes aos tratamentos convencionais, com cisplatina por exemplo (SHINTANI *et al.*, 2011).

Outras análises dos efeitos dos óleos essenciais podem ser feitas em modelos *in vivo*. O câncer de pulmão e de vias aéreas poder ser induzido através da aplicação de carcinógenos específicos do tabaco, como as nitrosaminas e as aminas aromáticas (XUE *et al.*, 2014). Também é descrito um modelo de câncer de pulmão induzido através de aplicação nasal de solução contendo adenovírus, que transformam células pulmonares provocando a perda funcional da proteína p53, e conseqüentemente o surgimento de tumores (JACKSON *et al.*, 2005). Dessa forma seria possível escolher a melhor via de aplicação desses compostos, medir o crescimento de tumores induzidos nos camundongos tratados, quantificar a angiogênese no tumor, entre outras medidas que poderiam indicar a eficácia desses tratamentos.

Esse trabalho fornece subsídios para novos estudos que visem avaliar efeitos mais específicos dos óleos essenciais supracitados, sobretudo sobre a produção de TGF- $\beta$  em modelos tumorais *in vivo*. Ressaltando que esse é o primeiro estudo que avalia a produção de TGF- $\beta$  em linhagens tumorais sob tratamento com esses óleos essenciais.

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados aqui apresentados demonstram que OEMV e OEOG apresentaram atividades semelhantes, e se mostraram eficientes em reduzir a viabilidade da linhagem de células de adenocarcinoma humano de pulmão avaliada. E que o OEMV foi mais eficiente em exercer esses efeitos, apresentando IC50 inferior.

Apesar dos efeitos citotóxicos apresentados pelo Eugenol, o OEOG foi mais eficiente, do que o seu composto majoritário isolado, em reduzir a viabilidade das células da linhagem A549.

Também se constatou que ambos os extratos foram capazes de induzir algum arraste de ciclo celular, principalmente na fase S.

Concentrações mais elevadas dos óleos induziram fragmentação de DNA, que foi observado através do aumento da quantidade de DNA subdiploide e do aumento da fragmentação de DNA registrada pelo ensaio de TUNEL. Indicando que o óleo essencial foi capaz de induzir apoptose.

Também foi observada a redução da citocina TGF- $\beta$ 1 no sobrenadante da linhagem de células A549, tratadas com OEMV e OEOG. Uma importante propriedade desses extratos, tendo em vista o papel que essa citocina exerce na patogênese do câncer e sua relação com a resistência a drogas antitumorais.

## 7 REFERÊNCIAS

ADAMS, R.P.. 1995. Identification of Essential oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. **Allured Publishing Corporation**. 469 p.

AMERICAN CANCER SOCIETY. 2014. Cancer facts and figures.

AN, Y.S.; KIM, M.R.; LEE, S.S.; LEE, Y.S.; CHUNG, E.; SONG, J.Y.; LEE, J.; YI, J.Y.. 2013. TGF- $\beta$  signaling plays an important role in resisting  $\gamma$ -irradiation. **Experimental Cell Research** **319**: 466–473.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M.. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology** **46**: 446–475

BANERJEE, S.; PANDA, C.K.; DAS, S.. 2006. Clove (*Syzygium aromaticum* L.), a potential chemopreventive agent for lung cancer. **Carcinogenesis** **27(8)**: 1645–1654.

BAPTISTA, M.M.; RAMOS, M.A.; ALBUQUERQUE, U.P.; COELHO-DE-SOUZA, G.; RITTER, M.R.. 2013. Traditional botanical knowledge of artisanal fishers in southern Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine** **9**: 54.

BHALLA, Y.; GUPTA, V.K.; JAITAK, V.. 2013. Anticancer activity of essential oils: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. **93**: 3643–3653.

BO, S.; HUI, H.; LI, W.; HUI, L.; HONG, X.; LIN, D.; WEN-XIANG, D.; YOU-HUA, W.; XIAO-HONG, A.; HAO, J.; QI, S.. 2014. Chk1, but not Chk2, is responsible for G2/M phase arrest induced by diallyl disulfide in human gastric cancer BGC823 cells. **Food and Chemical Toxicology** **68**: 61–70.

CARTAXO, S.L.; SOUZA, M.M.A.; ALBUQUERQUE, U.P.. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology** **131**: 326–342.

CHANG, A.. 2011. Chemotherapy, chemoresistance and the changing treatment landscape for NSCLC. **Lung Cancer** **71**: 3–10.

CHEN, Y.; ZHOU, C.; GE, Z.; LIU, Y.; LIU, Y.; FENG, Y.; LI, S.; CHEN, G.; WEI, T.. 2013. Composition and potential anticancer activities of essential oils obtained from myrrh and frankincense. **Oncology Letters 6**: 1140-1146.

CHOI, B.B.R.; SHIN, S.H.; KIM, U.K.; HONG, J.W.; KIM, G.C.. 2011. S Phase Cell Cycle Arrest and Apoptosis is Induced by Eugenol in G361 Human Melanoma Cells. **International Journal of Oral Biology, 36(3)**: 129-134

COCHONNEAU, D.; TERME, M.; MICHAU, A.; DORVILLIUS, M.; GAUTIER, N.; FRIKECHE, J.; ALVAREZ-RUEDA, N.; BOUGRAS, G.; AUBRY, J.; PARIS, F.; BIRKLÉ, S.. 2013. Cell cycle arrest and apoptosis induced by O-acetyl-GD2-specific monoclonal antibody 8B6 inhibits tumor growth in vitro and in vivo. **Cancer Letters 333**: 194–204.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J.. 2005. Plants as a source of anti-cancer agents. **Journal of Ethnopharmacology 100**: 72–79.

Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE), Version 3.0, CANCER THERAPY EVALUATION PROGRAM, DCTD, NCI, NIH, DHHS.

DE LAS LLAGAS, M.C.; SANTIAGO, L.; RAMOS, J.D.. Cytotoxicity and Apoptotic Activity of Ficus pseudopalma Blanco Leaf Extracts Against Human Prostate Cancer Cell Lines. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research. 13 (1)**: 93-100

DELA CRUZ, C.S.; TANOUE, L.T.; MATTHAY, R.A.. 2011. Lung Cancer: Epidemiology, Etiology and Prevention. **Clinics in Chest Medicine. 32**: 605–644.

DERYNCK, R.; AKHURST, R.J.; BALMAIN, A.. 2001. TGF- $\beta$  signaling in tumor suppression and cancer progression. **Nature Genetics 29**: 117 – 129.

DICHEVA, B.M.; KONING, G.A.. 2014. Targeted thermosensitive liposomes: an attractive novel approach for increased drug delivery to solid tumors. **Expert Opinion on Drug Delivery (1)**:83-10.

DOLL, R.;M.D., M.R.C.P.; HILL, A.B.. 1950. Smoking and carcinoma of the lung. **British Medical Journal. Setembro 1950.** 739-748.

DONATELLI, S.S.; ZHOU, J.M.; GILVARY, D.L.; EKSIUGLU, E.A.; CHEN, X.; CRESS, W.D.; HAURA, E.B.; SCHABATH, M.B.; COPPOLA, D.; WEI, S.; DJEU, J.Y.. 2014. TGF- $\beta$ -inducible microRNA-183 silences tumor-associated natural killer cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences. 111(11):** 4203–420.

DUYMUS, H.G.; ÇİFTÇİ, G.A.; YILDIRIM, S.U.; DEMIRCI, B.; KIRIMER, N.. 2014. The cytotoxic activity of *Vitex agnus castus* L. essential oils and their biochemical mechanisms. **Industrial Crops and Products. 55:** 33–42.

ELMORE, S.. 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicologic Pathology. 35:**495–516.

ETTINGER, D.S.; AKERLEY, W.; BORGHAEI, W.; CHANG, A.C.; CHENEY, R.T.; CHIRIEAC, L.R.; D'AMICO, T.A.; DEMMY, T.L.; GANTI, A.K.P.; GOVINDAN, R.; GRANNIS JR.; F.W.; HORN, L.; JAHAN, T.M.; JAHANZEB, M.; KESSINGER, A.; KOMAKI, R.; KONG, F.M.; KRIS, M.G.; KRUG, L.M.; LENNES, I.T.; LOO JR., B.W.; MARTINS, R.; O'MALLEY, J.; OSARODIAGBON, R.U.; OTTERSON, G.A.; PATEL, J.D.; PINDER-SCHENCK, M.C., PISTERS, K.M.; RECKAMP, K.; RIELY, G.J.; ROHREN, E.; SWANSON, S.J.; WOOD, D.E.; YANG, S.C.; HOGHES, M.; GREGORY, K.M.. 2012. Non-small cell lung cancer. **The Official journal of the National Comprehensive Cancer Network. 10:** 1236-1271

EVAN, G.I.; VOUSDEN, K.H.. 2001. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. **Nature. 411(6835):** 342-348.

FAJERSZTAJN, L.; VERAS, M.; BARROZO, L.V.; SALDIVA, P.. 2013. Air pollution: a potentially modifiable risk factor for lung cancer. **Nature Reviews Cancer. 13:**674–678

FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; ERVIK, M.; DIKSHIT, R.; ESER, S.; MATHERS, C.; REBELO, M.; PARKIN, D.M.; FORMAN, D.; BRAY, F. 2013. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on day/month/year (acessado em março de 2014)

FERRAZ, R.P.C.; BOMfim, D.S.; CARVALHO, N.C.; SOARES, M.B.P.; SILVA, T.B.; MACHADO, W.J.; PRATA, A.P.N.; COSTA, E.V.; MORAES, V.R.S.; NOGUEIRA, P.C.L.; BEZERRA, D.P.. 2013. Cytotoxic effect of leaf essential oil of *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae). **Phytomedicine** **20**: 615–621.

FLAVELL, R.A., SANJABI, S.; WRZESINSKI, S.H.; LICONA-LIMÓN, P.. 2010. The polarization of immune cells in the tumour environment by TGF- $\beta$ . **Nature Review Immunology**. **10(8)**: 554-67.

FOGAÇA, R.T.H.; CAVALCANTE, A.D.A.; SERPA, A.K.L.; SOUSA, P.J.C.; COELHO-DE-SOUZA, A.N.; LEAL-CARDOSO, J.H.. 1998. The effects of essential oil of *Mentha x villosa* on skeletal muscle of the toad. **Phytotherapy Research**. **11(8)**: 552–557.

FONSECA, L.A.M.; ELUF-NETO, J.; WUNSCH-FILHO, V.. 2010, Tendências da mortalidade por Câncer nas capitais dos estados do Brasil, 1980-2004. **Revista da Associação Médica Brasileira**. **56(3)**: 309-312

FREIRE, C.M.M.; MARQUES, M.O.M.; COSTA, M.. 2006. Effects of seasonal variation on the central nervous system activity of *Ocimum gratissimum* L. essential oil. **Journal of Ethnopharmacology** **105**: 161–166

FREIRE, C.M.M.; MARQUES, M.O.M.; COSTA, M.. 2006. Effects of seasonal variation on the central nervous system activity of *Ocimum gratissimum* L. essential oil. **Journal of Ethnopharmacology** **105**: 161–166

FUXE, J.; KARLSSON, M.C.I.. 2012. TGF-induced epithelial-mesenchymal transition: A link between cancer and inflammation. **Seminars in Cancer Biology** **22**: 455– 461

GHOSH, R.; NADIMINTY, N.; FITZPATRICK, J.E.; ALWORTH, W.L.; SLAGA, T.J.; KUMAR, A.P.. 2005. Eugenol causes melanoma growth suppression through inhibition of E2F1 transcriptional activity. **Journal of Biological Chemistry**. **280(7)**: 5812–5819.

GHOSH, R.; NADIMINTY, N.; FITZPATRICK, J.E.; ALWORTH, W.L.; SLAGA, T.J.; KUMAR, A.P.. Eugenol causes melanoma growth suppression through inhibition of E2F1 transcriptional activity. **Journal of Biological Chemistry**. **280(7)**: 5812–5819.

HANAHAH, D.; WEINBERG, R.A.. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell** **144**: 646

HASHIMOTO, T.; JUSO, K.; NAKANO, M.; NAGANO, T.; KAMBAYASHI, S.; NAKASHIMA, A.; KIKKAWA, U.; KAMADA, S.. 2012. Preferential Fas-mediated apoptotic execution at G1 phase: the resistance of mitotic cells to the cell death. **Cell Death and Disease** **2012(3)** e313.

HEINRICH, M.; BREMNER, P.. 2006. Ethnobotany and Ethnopharmacy – Their Role for Anti-Cancer Drug Development. **Current Drug Targets**. **7**: 239-245.

HU, Y.P.; TAN, Z.J.; WU, X.S.; LIU, T.Y.; JIANG, L.; BAO, R.F.; SHU, Y.J.; LI, M.L.; WENG, H.; DING, Q.; TAO, F.; LIU, Y.B.. 2014. Triptolide Induces S Phase Arrest and Apoptosis in Gallbladder Cancer Cells. **Molecules**. **19**: 2612-2628.

INCA, 2013. Banco de dados de mortalidade disponível em <http://mortalidade.inca.gov.br/> atualizado em 18/07/2013 (acessado em março de 2014)

JACKSON, E.L.; OLIVE, K.P.; TUVESON, D.A.; BRONSON, R.; CROWLEY, D.; BROWN, M.; JACKS, T.. 2005. The Differential Effects of Mutant p53 Alleles on Advanced Murine Lung Cancer. **Cancer Research**. **65**: 10280-10288.

JAGANATHAN, S.K.; MAZUMDAR, A.; MONDHE, D.; MANDAL, M.. 2011. Apoptotic effect of eugenol in human colon cancer cell lines. **Cell Biology International**. **35(6)**: 607-615

JEMAL, A.; CENTER, M.M.; DESANTIS, C.; WARD, E.M.. 2010. Global Patterns of Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**. **19(8)**: 1893-907

JEMAL, D.V.M.A; BRAY, F.; PHD; CENTER, M.M., FERLAY, J.M.E.; WARD, E.; FORMAN, D. 2011. Global Cancer Statistics. **CA Cancer Journal for Clinicians**, **61**:69–90.

JIA-LIANG, W.; DAN-WEI, M.; YA-NAN, W.; HONG, Z.; BING, H.; QUN, L.; ZHI-YAN, Z.; JING, F.. 2013. Cytotoxicity of Essential Oil of *Chenopodium ambrosioides* L against Human Breast Cancer MCF-7 Cells. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**. **12 (6)**: 929-933.

KALEMKERIAN, G.P.; AKERLEY, W.; BOGNER, P.; BORGHAEI, H.; CHOW, L.Q.M.; DOWNEY, R.J.; GANDHI, L.; GANTI, A.K.P.; GOVIDAN, R.; GRECUA, J.C.; HAYMAN, J.; HEIST, R.S.; HORN, L.; JAHAN, T.; KOCZYWAS, M.; LOO JR., B.W.; MERRITT, R.E.; MORAN, C.A.; NIELL, H.B.. O'MALLEY, J.; PATEL, J.D.; READY, N.; RUDIN, C.M.; WILLIAMS JR., C.C.; GREGORY, K.; HUGHES, M.. 2013. Small Cell Lung Cancer. **The Official journal of the National Comprehensive Cancer Network**. **11**: 78-98

KUMAR, S.; GULERIA, R.; MOHAN, A.; SINGH, V.; BHARTI, A.C.; DAS, B.C.. 2011. Efficacy of Plasma TGF- $\beta$ 1 Level in Predicting Therapeutic Efficacy and Prognosis in Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. **Cancer Investigation**. **29**: 202–207.

KWONG, K.Y.C.; LITERAT, A.; ZHU, N.L.; HUANG,C.LI, H.H.; JONES, C.A.; MINOO, P.. 2004. Expression of transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ 1) in human epithelial alveolar cells: a pro-inflammatory mediator independent pathway. **Life Sciences** **74**: 2941 – 2957

LAHLOU, S.; CARNEIRO-LEÃO, R.F.; LEAL-CARDOSO, J.H.; TOSCANO, C.F.. 2001. Cardiovascular effects of the essential oil of *Mentha x villosa* and its main constituent, piperitenone oxide, in normotensive anaesthetised rats: role of the autonomic nervous system. **Planta Medica**.**67(7)**: 638-43.

LEBRUN, J.J.. 2012. The Dual Role of TGF $\beta$  in Human Cancer: From Tumor Suppression to Cancer Metastasis. **Molecular Biology** **2012 (381428)**: 28 páginas.

LI, Y.; SHI, X.; ZHANG, J.; ZHANG, X.; MARTIN, R.C.G.. 2014. Hepatic protection and anticancer activity of curcuma: A potential chemopreventive strategy against hepatocellular carcinoma. **International Journal of Oncology. 44:** 505-513.

LIN, K.W.; LIN, Z.Y.; HUANG, A.; WENG, J.R.; YEN, M.H., YANG, S.C.; LIN, C.N.. 2014. Lantabetulic Acid Derivatives Induce G1 Arrest and Apoptosis in Human Prostate Cancer Cells. **Archiv der Pharmazie - Chemistry in Life Sciences. 347:** 42–53.

LIU, Y.; SONG, M.; CHE, T.M.; BRAVO, D.; PETTIGREW, J.E.. 2012. Anti-inflammatory effects of several plant extracts on porcine alveolar macrophages in vitro. **Journal of Animal Science. 90:** 2774–2783.

LIU, Y.; WANG, W.; FANG, B.; MA, F.; ZHENG, Q.; DENG, P.; ZHAO, S.; CHEN, M.; YANG, G.; HE, G.. 2013. Anti-tumor effect of germacrone on human hepatoma cell lines through inducing G2/M cell cycle arrest and promoting apoptosis. **European Journal of Pharmacology. 698:** 95–102.

LOOS, C.; SYROVETS, T.; MUSYANOVYCH, A.; MAILÄNDER, V.; LANDFESTER, K.; SIMMET, T.. 2014. Amino-functionalized nanoparticles as inhibitors of mTOR and inducers of cell cycle arrest in leukemia cells. **Biomaterials 35:** 1944-1953.

MAIA; E.A.; FRANCISCO, J.; PIRES, T.; MANFREDI-COIMBRA, S.. 2011. O uso de espécies vegetais para fins medicinais por duas comunidades da Serra Catarinense, Santa Catarina, Brasil. **Revista de Biologia e Ciências da Terra. 11(1).**

MASSAGUÉ, J.. 2004. G1 cell-cycle control and cancer. **Nature 432(18):** 298-306.

MASSAGUÈ, J.. 2012. TGF $\beta$  signaling in context. **Nature Reviews Molecular Cell Biology. 13.10:** 616

MEDEIROS, M.F.T.; SENNA-VALLE, L.; ANDREATA, R.H.P.. 2012. Botanical Species as Traditional Therapy: A Quantitative Analysis of the Knowledge Among Ranchers in Southeastern Brazil. **Complementary Therapies for the Contemporary Healthcare. 147 – 162.**

MEDEIROS, P.M.; LADIO, A.H.; ALBUQUERQUE, U.P.. 2013. Patterns of medicinal plant use by inhabitants of Brazilian urban and rural areas: A macroscale investigation based on available literature. **Journal of Ethnopharmacology** **150**: 729–746

MOSMANN, T.. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods** **65**, 55–63.

MOURA-COSTA, G.F.; NOCCHI, S.R.; CEOLE, L.F.; MELLO, J.C.P.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P.; TEMPONI, L.G.; UEDA-NAKAMURA, T.. 2012. Antimicrobial activity of plants used as medicinals on an indigenous reserve in Rio das Cobras, Parana, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology** **143**: 631–638.

MUKHERJEE, P.; WINTER, S.L.; ALEXANDROW, M.G.. 2010. Cell Cycle Arrest by Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 near G1/S Is Mediated by Acute Abrogation of Prereplication Complex Activation Involving an Rb-MCM Interaction. **Molecular and Cellular Biology**. **2010**: 845–856.

OLIVEIRA, G.L.; OLIVEIRA, A.F.M.; ANDRADE, L.H.C.. 2010. Plantas medicinais utilizadas na comunidade urbana de Muribeca, Nordeste do Brasil. **Acta Botânica Brasileira**. **24(2)**: 571-577.

PATEL, N.; ADATIA, R.; MELLEMGAAARD, A.; JACK, R.; MØLLER, H.. 2007. Variation in the use of chemotherapy in lung cancer. **British Journal of Cancer**. **96**: 886 – 890.

PHILLIPS, D.H.. 1990. Further evidence that eugenol does not bind to DNA in vivo. **Mutation Research**. **245(1)**: 23–26.

PRABHU, K.S.; LOBO, R.; SHIRWAIKAR, A.A.; SHIRWAIKAR, A.. 2009. Ocimum gratissimum: A Review of its Chemical, Pharmacological and Ethnomedicinal Properties. **The Open Complementary Medicine Journal**. **2009(1)**: 1-15.

RICCARDI, C.; NICOLETTI, I.. 2006. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Nature Protocols**. **1(3)**: 1458:1461

SARRAF, D.P.; RAUNIAR, G.P.; SANGRAULA, H.. 2013. Effect of leaf extract of *Ocimum gratissimum* on central nervous system in mice and rats. **Health Renaissance. 11(3):** 198-204.

SHANKER, M.; WILLCUTTS, D.; ROTH, J.A.; RAMESH, R.. 2010. Drug resistance in lung cancer. **Lung Cancer: Targets and Therapy 2010(1):** 23–36.

SHINTANI, Y.; OKIMURA, A; SATO, K.; NAKAGIRI, T.; KADOTA, Y.; INOUE, M.; SAWABATA, N.; MINAMI, M.; IKEDA, N.; KAWAHARA, K.; MATSUMOTO, T.; MATSUURA, N.; OHTA, M.; OKUMURA, M.. 2011. Epithelial to Mesenchymal Transition Is a Determinant of Sensitivity to Chemoradiotherapy in Non-Small Cell Lung Cancer. **The Annals of Thoracic Surgery. 92:** 1794 –1804

SUKUMARAN, K.; UNNIKRIISHNAN, M.C.; KUTTAN, R.. 1994. Inhibition of tumour promotion in mice by eugenol. **Indian Journal of Physiology and Pharmacology. 38(4):** 306–308.

TANKAM, J.M.; ITO, M.. 2014. Sedative, anxiolytic and antidepressant-like effects of inhalation of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. from cameroon in mice. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry 2(5):** 1-9

THOMSON, D.; NORBECK, K.; OLSON, L.; TESODOSIU, J.V.; ZEE, P. 1984. Moldeus, Peroxidasecatalyzed oxidation of eugenol: formation of a cytotoxic metabolite(s). **Journal of Biological Chemistry. 264(2):** 1016–1021.

TRAN, K.Q.; TIN, A.S.; FIRESTONE, G.L.. 2014. Artemisinin triggers a G1 cell cycle arrest of human Ishikawa endometrial cancer cells and inhibits cyclin-dependent kinase-4 promoter activity and expression by disrupting nuclear factor- $\kappa$ B transcriptional signaling. **Anti-Cancer Drugs. 25:** 270–281

TRAN, K.Q.; TIN, A.S.; FIRESTONE, G.L.. 2014. Artemisinin triggers a G1 cell cycle arrest of human Ishikawa endometrial cancer cells and inhibits cyclin-dependent kinase-4 promoter activity and expression by disrupting nuclear factor-KB transcriptional signaling. **Anti-Cancer Drugs 25:** 270–281

URREGO, D.; TOMCZAK, A.P.; ZAHED, F.; STÜHMER, W.; PARDO, L.A.. 2014. Potassium channels in cell cycle and cell proliferation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. **369**: 1-9.

VERÍSSIMO, G.; MENDONÇA, R.; MEYER, A.. 2013. Mortalidade de mineiros brasileiros por câncer entre 1979–2005. *Cadernos de Saúde Coletiva*. **21 (3)**: 281-288.

VIEIRA, R.F.; GRAYER, R.J.; PATON, A.; SIMON, J.E.. 2001. Genetic diversity of *Ocimum gratissimum* L. based on volatile oil constituents, flavonoids and RAPD markers. *Biochemical Systematics and Ecology* **29**: 287-304.

XU, C.C.; WU, L.M.; SUN, W.; ZHANG, N.; CHEN, W.S.; FU, X.N.. 2011. Effects of TGF- $\beta$  signaling blockade on human A549 lung adenocarcinoma cell lines. *Molecular Medicine Reports* **4**: 1007-1015.

Xue, J.; Yang, S.; Seng, S.. 2014. Mechanisms of Cancer Induction by Tobacco-Specific NNK and NNN. *Cancers*. **6**: 1138-1156

YOO, C.B.; HAN, K.T.; CHO, K.S.; HA, J.; PARK, H.J.; NAM, J.H.; KIL, U.H.; LEE, K.T.. 2005. Eugenol isolated from the essential oil of *Eugenia caryophyllata* induces a reactive oxygen species-mediated apoptosis in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. *Cancer Letters* **255(1)**: 41-52.

YU, X.; YANG, X.; HORTE, S.; KIZAKKEDATHU, J.N.; BROOKS, D.E.. 2014. A pH and thermosensitive choline phosphate-based delivery platform targeted to the acidic tumor microenvironment. *Biomaterials* **35**: 278-286.

ZHANG, X.; GONÇALVES, R.; MOSSER, D.M.. 2008. The Isolation and Characterization of Murine Macrophages. *Current Protocols in Immunology*. 14.1.

ZHAO, T.; SUN, Q.; DEL RINCON, S.V.; LOVATO, A.; MARQUES, M.; WITCHER, M.. 2013. Gallotannin Imposes S Phase Arrest in Breast Cancer Cells and Suppresses the Growth of Triple-Negative Tumors In Vivo. *Public Library Of Science*. **9(3)**: e92853.

ZONG, H.; YIN, B.; ZHOU, H.; CAI, D.; MA, B.; XIANG, Y.. 2014. Inhibition of mTOR pathway attenuates migration and invasion of gallbladder cancer via EMT inhibition.

**Molecular Biology Reports. 41:4507–4512.**