

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Mayna da Silveira Gomide

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICANCERÍGENA DE ÓLEOS
ESSENCIAIS DE CINCO ESPÉCIES DE *LIPPIA* (VERBENACEAE)**

Juiz de Fora – MG – Brasil

2012

MAYNA DA SILVEIRA GOMIDE

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICANCERÍGENA DE ÓLEOS
ESSENCIAIS DE CINCO ESPÉCIES DE *LIPPIA* (VERBENACEAE)**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dra. Ana Paula Ferreira
Co-orientadoras: Prof^a. Dra. Cintia Marques Coelho e
Prof^a. Dra. Miriam Teresa Paz Lopes

Juiz de Fora – MG – Brasil

2012

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Gomide, Mayna da Silveira.

Avaliação da atividade anticancerígena de óleos essenciais de cinco espécies de *Lippia* (Verbenaceae) / Mayna da Silveira Gomide. -- 2012.

93 f. : il.

Orientadora: Ana Paula Ferreira

Coorientadora: Cintia Marques Coelho

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2012.

1. *Lippia*. 2. Óleo essencial. 3. MicroRNA. 4. Ciclo celular. 5. Câncer. I. Ferreira, Ana Paula, orient. II. Coelho, Cintia Marques, coorient. III. Título.

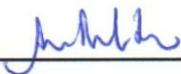
MAYNA DA SILVEIRA GOMIDE

**Avaliação da atividade anticancerígena de óleos essenciais de cinco espécies de
Lippia (Verbenaceae)**

Dissertação de Mestrado submetida à banca examinadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Ênfase em Genética e Biotecnologia, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 19 / 12 / 2012.

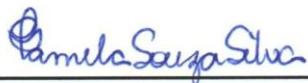
BANCA EXAMINADORA:



Prof.ª. Dr.ª. Ana Paula Ferreira

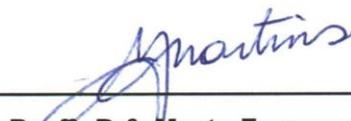
Orientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof.ª. Dr.ª. Pâmela Souza Silva

SURPEMA - Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde de Juiz de Fora



Prof.ª. Dr.ª. Marta Fonseca Martins

Universidade Federal de Juiz de Fora

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”

OLIVER WENDELL HOLMES

***Aos meus pais Denise e Miguel
e ao meu irmão Thales***

AGRADECIMENTOS

À Profa. Cintia Marques Coelho, pela dedicada orientação, sempre presente, mesmo após sua mudança para Brasília. Obrigada pelo crescimento que me proporcionou a cada explicação ao longo do desenvolvimento desse projeto, com sua ampla visão científica.

À Profa. Miriam Teresa Paz Lopes, por ter aberto as portas do LSAT-UFMG para executarmos grande parte do projeto e pelas importantes discussões e decisões tomadas.

Ao Pesquisador Marco Antônio Machado, do Laboratório de Genética Molecular - Embrapa Gado de Leite, por toda disponibilidade e colaboração nos experimentos de microRNA.

À Profa. Ana Paula Ferreira, por ter assumido minha orientação e abraçado a finalização deste trabalho.

À Fernanda Lemos, pelo seu incansável trabalho com toda habilidade prática na manipulação, tratamento e análise das linhagens celulares, pelos ensinamentos, troca de ideias e pela amizade.

À colaboração do prof. Ricardo Fujiwara (UFMG) para as experimentações por citometria de fluxo e ao Dalton Dittz pelas contribuições na execução e análise dos ensaios.

Aos professores José Marcello e Jacy Gameiro pelas sugestões nas análises de citometria de fluxo do ciclo celular.

Aos amigos do LSAT, por me receberem carinhosamente e por me auxiliarem no laboratório.

À Daniele Ribeiro, pelo auxílio, discussões e análises na realização dos experimentos de microRNA.

Aos professores, Daniel Pimenta, Luciana Chedier e Magda Narciso Leite, pela colaboração na extração dos óleos essenciais.

À Dra. Tânia Maria Alves e ao Dr. Ezequias Siqueira Filho, do Centro de Pesquisas René Rachou - Fundação Oswaldo Cruz, pela colaboração nas análises de Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massa e à Junya Singulani pelo auxílio na execução e identificação dos compostos.

À profa. Nádia Raposo, pela participação nas primeiras etapas deste trabalho.

Ao prof. Lyderson Viccini pela permissão no uso das espécies de *Lippia* estudadas neste trabalho e ao Saulo de Souza por nos auxiliar na identificação das espécies na Casa de Vegetação.

À Julliane Dutra, Erick Esteves, Sara Malaguti, Sandra Bertelli, Luciano Mazzocoli e Caio Souza Alves, pelas assistências e sugestões.

Aos professores da Faculdade de Medicina da UFJF, Oscarina Ezequiel, Sandra Tibiriçá, Júlio Chebli, Ronald Roland e Célio Chagas pela compreensão e incentivo. Agradeço também à Lucilene e Gisele pela atenciosa amizade de todos os dias e aos demais colegas e professores da FACMED.

Aos meus queridos amigos Raquel e Vitor por me acolherem por tanto tempo em sua casa, sempre disponíveis e preocupados. À Raquel agradeço em especial pela fraterna amizade desde a infância e que continua sem barreiras de tempo e distância.

À Monique e Tatiana por tornarem muitos momentos em BH menos solitários.

À Raquel, Mari, Dani, Letícia, Pat, Polyana, Karina, Verônica, Maria Angélica e Nanda pela união e amizade que nos ajuda a crescer dentro de um ideal. E a toda a Família Focolare, pelo amor e incentivo.

Às queridas Carol e Clarice por todo apoio e amizade.

À Fabiana, Lidimara, Sarah, Suzana, Cláudia, Gabriela e todos os amigos da turma da graduação, onde juntos começamos a nossa caminhada acadêmica.

Aos professores e colegas do Programa de Pós-graduação pelos valiosos ensinamentos, debates nas disciplinas e conversas sobre nossos projetos.

Aos amigos Marcelo e Luiz por estarem sempre presentes. E a todos os amigos da Academia Marcelo Santos pelos momentos de descontração e pela torcida.

Aos meus pais, meus maiores incentivadores e exemplos, pelo incondicional apoio, por serem força e amor em todos os momentos.

Ao meu irmão Thales, pelos auxílios, discussões sempre enriquecedoras de todo e qualquer assunto e pela amizade. E à Dayane pelo carinho e disponibilidade.

A todos os meus familiares por sempre me apoiarem e torcerem por mim.

Ao Dr. Luiz Gonzaga.

Ao Dr. Leonardo Vieira.

À FAPEMIG e UFJF, pelo apoio financeiro.

A Deus, por mais esta etapa.

E a todos que de alguma forma participaram deste trabalho.

RESUMO

Apesar de grandes avanços no campo do tratamento e controle da progressão do câncer, grandes lacunas ainda permanecem. Terpenóides encontrados nos óleos essenciais de plantas do gênero *Lippia*, já foram relatados como potenciais compostos anticancerígenos para alguns tipos de tumores. Desta forma, este estudo objetivou investigar a possível propriedade farmacológica como agente anticancerígeno sobre linhagens tumorais dos compostos presentes no óleo essencial de cinco espécies de *Lippia*. Os resultados mostraram, através de ensaio de MTT, efeito citotóxico nas linhagens de carcinoma de cólon de camundongo CT26.WT e de melanoma de pele humano MeWo, com IC50 e comprometimento da viabilidade celular acima de 50% sob ação dos óleos essenciais de *L. alba* quimiotipos geraniol e carvona, *L. sidoides*, *L. salviifolia*, *L. rotundifolia* e *L. lacunosa*. O ciclo celular foi bloqueado na fase G0/G1 após 24 h de tratamento da linhagem MeWo com os óleos de *L. alba* quimiotipos geraniol (50 µg/mL) e carvona (100 e 150 µg/mL) e *L. rotundifolia* (200 µg/mL). Além disso, os óleos de *L. alba* geraniol (200 µg/mL por 24 h) e *L. lacunosa* (10, 50, 100 e 200 µg/mL) provocaram morte celular de MeWo, caracterizada por elevada fragmentação de DNA, confirmada como apoptose para o óleo de *L. alba* geraniol por ensaio de TUNEL. Sobre a linhagem CT26.WT, o óleo de *L. alba* geraniol provocou parada de ciclo celular nas fases G0/G1 (10 µg/mL por 12 h; 10 e 200 µg/mL por 24 h) e G2/M (50 e 100 µg/mL por 12 e 24 h; 87 µg/mL por 72h). *L. sidoides* também provocou parada em G0/G1 com 100 µg/mL por 24 h e parada em G2/M com 100 e 150 µg/mL por 12 h e 150 µg/mL por 24 h. O óleo de *L. salviifolia* induziu apenas parada em G2/M na concentração de 150 µg/mL por 24 h, o de *L. rotundifolia*, parada em G0/G1 com 50, 100 e 200 µg/mL por 12 h e 50 µg/mL por 24 h. *L. lacunosa* (50 µg/mL com exposição de 72 h) provocou parada em G2/M. Os óleos de *L. alba* geraniol e *L. lacunosa*, no ensaio de 72h, provocaram aumento de DNA fragmentado, mas este não atingiu níveis tão elevados quanto aqueles observados para a linhagem MeWo. Tratamento de *L. alba* geraniol (200 µg/mL por 12 h) sobre MeWo e de *L. alba* geraniol, *L. lacunosa*, *L. rotundifolia* e *L. sidoides* (100 µg/mL por 12 h) sobre CT26.WT foram submetidos a análise de expressão diferencial de microRNAs através de *real-time* PCR com painel de 95 microRNAs relacionados a câncer. Os microRNAs de MeWo apresentaram-se *down*-regulados em relação ao controle negativo, que pode ter sido devido ao efeito apoptótico de *L. alba* geraniol sobre esta linhagem. Sobre CT26.WT, 26 microRNAs para os óleos de *L. alba* geraniol e *L. lacunosa* e 35 para *L. rotundifolia* e *L. sidoides* foram encontrados significativamente ($p < 0,05$) desregulados em relação ao controle. Os óleos essenciais das espécies de *Lippia* testados, portanto, comprometeram a viabilidade celular das linhagens MeWo e CT26.WT, indicando que podem ser bons candidatos como fonte de biomoléculas anticâncer.

Palavras-chave: *Lippia*, óleo essencial, microRNA, ciclo celular, câncer

ABSTRACT

Despite the great progress in the treatment and progressive control of cancer, significant gaps still remain. Terpenoids which were found in the essential oils of several species from the genus *Lippia* were reported as potential anticancer compounds for some types of tumors. Consequently, this study aimed to investigate the possible pharmacological property as anticancer agent against tumor cell lines of compounds present in the essential oil of five *Lippia* species. The results showed, through the MTT assay, cytotoxic effect on mouse colon carcinoma cell lines CT26.WT and human skin melanoma MeWo with IC50 and effect on the cell viability above 50% under the use of essential oils of *L. alba* chemotypes geraniol and carvone, *L. sidoides*, *L. salviifolia*, *L. rotundifolia* and *L. lacunosa*. The cell cycle was arrested in G0/G1 phase after 24 h treatment of MeWo with the oils of *L. alba* chemotypes geraniol (50 µg/ml) and carvone (100 and 150 µg/mL) and *L. rotundifolia* (200 µg/mL). Additionally, the oils of *L. alba* geraniol (200 µg/mL for 24 h) and *L. lacunosa* (10, 50, 100 and 200 µg/mL) resulted in cell death of MeWo, characterized by high DNA fragmentation, and it was confirmed as apoptosis for the *L. alba* geraniol oil by TUNEL assay. As far as the CT26.WT cell line is concerned, the oil of *L. alba* geraniol caused cell cycle arrest in G0/G1 (10 µg/ml for 12 h, 10 and 200 µg/ml for 24 h) and G2/M (50 to 100 µg/ml for 12 and 24 h; 87 µg/ml for 72 h) phases. The *L. sidoides* also caused an arrest in G0/G1 with 100 µg/ml during 24 h and an arrest in G2/M with 100 and 150 µg/ml for 12 h and 150 µg/ml for 24 h. The *L. salviifolia* oil only induced stops in G2/M at a concentration of 150 µg/ml for 24 h, the oil of *L. rotundifolia* only stops in G0/G1 with 50, 100 and 200 µg/ml for 12 h and 50 µg/ml for 24 h. *L. lacunosa* (50 µg/ml with 72 h of exposure) caused an arrest in G2/M. The *L. alba* geraniol and *L. Lacunosa* oils, in the 72h assay, caused an increase in fragmented DNA, but this did not reach levels as high as those observed for the MeWo cell line. Treatment of *L. alba* geraniol (200 µg/ml for 12 h) on MeWo and *L. alba* geraniol, *L. lacunosa*, *L. rotundifolia* and *L. sidoides* (100 µg/ml for 12 hours) on CT26.WT were subjected to analysis of differential expression of microRNAs by real-time PCR with a panel of 95 cancer-related microRNAs. All MeWo microRNAs showed downregulation compared to the negative control, which may have been due to the apoptotic effect of *L. alba* geraniol against this cell line. About CT26.WT 26 microRNAs for *L. alba* geraniol and *L. lacunosa* oils and 35 for *L. rotundifolia* and *L. sidoides* were found significantly desregulated ($p < 0.05$) compared to control. The essential oils of tested *Lippia* species thus affected cell viability of MeWo and CT26.WT cell lines, indicating they might be good candidates as source of new anticancer biomolecules.

Keywords: *Lippia*, essential oil, microRNA, cell cycle, cancer

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos do ciclo celular.	25
Figura 2. Biossíntese dos terpenos.	29
Figura 3. Biogênese dos microRNAs.	34
Figura 4. Fotos ilustrativas de <i>Lippia</i>	39
Figura 5. Histogramas representativos da distribuição das fases do ciclo celular em células da linhagem MeWo após tratamento de 12 ou 24 h com óleos essenciais de <i>Lippia</i> em diferentes concentrações comparadas ao controle negativo.	52
Figura 6. Histogramas representativos da distribuição das fases do ciclo celular em células da linhagem CT26.WT após tratamento de 12, 24 ou 72 h com óleos essenciais de <i>Lippia</i> em diferentes concentrações comparadas ao controle negativo.	54
Figura 7. Análise de morte celular por apoptose através de TUNEL após tratamento com óleos de <i>Lippia</i> sobre a linhagem MeWo comparados ao controle não tratado e aos controles negativo e positivo do kit.....	58
Figura 8. MicroRNAs diferencialmente expressos na linhagem MeWo...	62
Figura 9. <i>Heatmap</i> dos microRNAs diferencialmente expressos na linhagem CT26.WT após tratamento com óleos de <i>Lippia</i>	63
Figura 10. MicroRNAs significativamente <i>up</i> -regulados em linhagem CT26.WT após tratamento com óleos essenciais de <i>Lippia</i>	64
Figura 11. MicroRNAs significativamente <i>down</i> -regulados em linhagem CT26.WT após tratamento com óleos essenciais de <i>Lippia</i>	65

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Componentes majoritários (percentuais acima de 6%) presentes no óleo essencial de <i>L. alba</i> quimiotipo geraniol, <i>L. alba</i> quimiotipo carvona, <i>L. sidoides</i> , <i>L. salviifolia</i> , <i>L. rotundifolia</i> e <i>L. lacunosa</i> em duas extrações (outubro de 2009 a fevereiro de 2010 - 1ª extr. - e de novembro a dezembro de 2010 - 2ª extr.) (IK: Índice de Kovats).....	48
Tabela 2. Valores de IC50 obtidos após ensaio antiproliferativo dos óleos de <i>Lippia</i> sobre as linhagens de células tumorais e a linhagem normal.	49
Tabela 3. Valores obtidos para inibição celular acima de 50% na concentração de 100 µg/mL após ensaio antiproliferativo dos óleos de <i>Lippia</i> sobre as linhagens de células tumorais e a linhagem normal.....	49
Tabela 4. Porcentagem populacional de células da linhagem MeWo nas fases sub-G1 (DNA sub-diplóide), G0/G1, S e G2/M do ciclo celular submetidas a tratamento com os óleos essenciais de <i>L. alba</i> quimiotipo geraniol, <i>L. alba</i> quimiotipo carvona, <i>L. rotundifolia</i> e <i>L. lacunosa</i> , nas concentrações de 10, 50, 100 e 150 ou 200 µg/mL, após 12 e 24 h de exposição. As diferenças estatísticas em relação ao controle não tratado foram determinadas por ANOVA seguido de teste de Bonferroni ($p < 0,05$).....	51
Tabela 5. Porcentagem populacional de células da linhagem CT26.WT nas fases sub-G1 (DNA sub-diplóide), G0/G1, S e G2/M do ciclo celular submetidas a tratamento com os óleos essenciais de <i>L. alba</i> quimiotipo geraniol, <i>L. sidoides</i> , <i>L. salviifolia</i> e <i>L. rotundifolia</i> , nas concentrações de 10, 50, 100 e 150 ou 200 µg/mL, após 12 e 24 h de exposição. As diferenças estatísticas em relação ao controle não tratado foram determinadas por ANOVA seguido de teste de Bonferroni ($p < 0,05$).....	53
Tabela 6. Porcentagem populacional de células da linhagem CT26.WT nas fases sub-G1 (DNA sub-diplóide), G0/G1, S e G2/M do ciclo celular submetidas a tratamento com os óleos essenciais de <i>L. alba</i> quimiotipo geraniol, <i>L. sidoides</i> , <i>L. salviifolia</i> , <i>L. lacunosa</i> e <i>L. rotundifolia</i> , nas concentrações de 87,00; 19,05; 30,20; 50,00 e 36,30 µg/mL, respectivamente, após 72 h de exposição. As diferenças estatísticas em relação ao controle não tratado foram determinadas por ANOVA seguido de teste de Bonferroni ($p < 0,05$).	53
Tabela 7. Perfil de expressão dos microRNAs diferencialmente expressos após tratamento com óleos essenciais de <i>Lippia</i> nas linhagens celulares MeWo e CT26.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcento
°C	Graus Celsius
µg	microgramas (10^{-6} g)
µL	microlitros (10^{-6} L)
µm	micrômetros (10^{-6} m)
µM	Micromolar (10^{-6} M)
A-CDK1	Complexo protéico ciclina A-quinase dependente de ciclina 1
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> – Análise de Variância
anti-BrdU	anticorpo
B-CDK1	Complexo protéico ciclina B-quinase dependente de ciclina 1
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i> -linfoma de células B 2
BrdU	<i>deoxythymidine analog 5-bromo-2'-deoxyuridine 5'</i>
BrdUTP	<i>deoxythymidine analog 5-bromo-2'-deoxyuridine 5'-triphosphate</i>
C30	Triterpeno
C40	Tetraterpeno
CD86	<i>Cluster of Differentiation 86</i> - Cluster de diferenciação
CDK	<i>Cyclin-dependent kinase</i> - Quinase dependente de ciclina
CDKIs	<i>Cyclin-dependent kinase</i> inibitor – Inibidor de quinase dependente de ciclina
cDNA	DNA complementar
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa
Ct	<i>Threshold cycle</i> – Ciclo limite
D.O.	Densidade Óptica
D-CDK4	Complexo protéico ciclina D-quinase dependente de ciclina 4
D-CDK6	Complexo protéico ciclina D-quinase dependente de ciclina 6
DMAPP	Dimetialil pirofosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> - Ácido desoxirribonucleico
dsRBP	<i>double stranded RNA Binding Protein</i> – Proteína de ligação a RNA de fita dupla
E-CDK2	Complexo protéico ciclina E-quinase dependente de ciclina 2
ERK5	<i>Extracellular-signal-regulated kinase 5</i> – Quinase 5 regulada por sinal extracelular
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i> - Soro fetal bovino
FPP	Farnesil pirofosfato
FXR	<i>Farnesoid X Receptor</i> - Receptor farnesóide X
g	grama
G0	<i>Gap 0</i> -Intervalo 0
G1	<i>Gap 1</i> -Intervalo 1
G2	<i>Gap 2</i> -Intervalo 2
GGPP	Geranilgeranil pirofosfato
GPP	Geranil pirofosfato
h	hora
HEPES	N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-ácido etanosulfônico)
IC50	Índice de concentração correspondente a 50% de morte celular
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
INCA	Instituto Nacional do Câncer

InK4	Inibidor de quinase 4
IPP	Isopentenil pirofosfato
M	Mitose - fase do ciclo celular
m	metro
MDM2	<i>Mouse double minute 2</i> –proteína regulatória de TP53
mg	miligrama (10^{-3} g)
min	minuto
miRBase	Base de dados de microRNA
miRNA	MicroRNA
mL	mililitro (10^{-3} L)
mm	milímetro (10^{-3} m)
MTT	(brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] Difenil tetrazólio
MYC	<i>myelocytomatosis oncogene</i> - Proteína transdutora de sinal
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> - tampão fosfato salino
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> - Reação em cadeia da polimerase
pri-miRNA	Primeiro microRNA transcrito
qPCR	PCR Quantitativo
RAS	<i>Rat sarcoma viral oncogene homolog</i> - Proteína transdutora de sinal
RB1	Retinoblastoma 1 - gene/proteína
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> - Ácido ribonucleico
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> - Meio de cultura para células
S	Síntese - Fase do ciclo celular
TdT	Deoxinucleotidil transferase
TP53	<i>Tumor Protein p53</i> - gene que expressa a proteína p53
TUNEL	<i>Transferase dUTP Nick End Labeling</i>
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
USA	<i>United States of America</i> -Estados Unidos da América
UTR	<i>Untranslated Region</i> -Região não traduzida
v/v	Volume por volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 O PROBLEMA DO CÂNCER NO BRASIL	19
2.2 CICLO CELULAR, APOPTOSE E O CÂNCER	21
2.3 O GÊNERO <i>Lippia</i>	26
2.3.1 Caracterização, distribuição e potencial medicinal	26
2.3.2 Terpenos e a ação de compostos com potencial antitumorogênico	28
2.4 MicroRNAs E CÂNCER	32
3 OBJETIVOS	38
3.1 OBJETIVO GERAL	38
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
4 MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1 MATERIAL VEGETAL	39
4.2 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL	40
4.3 ANÁLISE DE CROMATOGRAFIA GASOSA/ESPECTROMETRIA DE MASSA	40
4.4 LINHAGENS CELULARES E CONDIÇÕES DE CULTIVO	41
4.5 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE	41
4.6 ANÁLISE DO CICLO CELULAR	42
4.7 ENSAIO DE APOPTOSE POR TUNEL (<i>terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling</i>)	44
4.8 ANÁLISE DE MicroRNA	45
5 RESULTADOS	47
5.1 COMPOSIÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS OBTIDOS DAS CINCO ESPÉCIES DE <i>Lippia</i>	47
5.2 EFEITO ANTIPROLIFERATIVO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS ESPÉCIES DE <i>Lippia</i> CONTRA AS LINHAGENS CELULARES TUMORAIS	48
5.3 EFEITO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS ESPÉCIES DE <i>Lippia</i> NA PROGRESSÃO DO CICLO CELULAR DAS LINHAGENS TUMORAIS MEWO E CT26.WT	51
5.4 AVALIAÇÃO DE APOPTOSE POR TUNEL EM LINHAGEM DE MELANOMA MEWO TRATADA COM ÓLEOS DE <i>Lippia</i>	57
5.5 EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE MicroRNAs EM CÉLULAS TUMORAIS TRATADAS COM ÓLEOS DE <i>Lippia</i>	59
6 DISCUSSÃO	66
7 CONCLUSÃO	75
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
APÊNDICE	93
APÊNDICE A	93

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Em um trabalho recente realizado pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA), que integrou registros brasileiros de diversos tipos de câncer, foi reportado que as neoplasias malignas são a segunda causa de morte no Brasil desde 2003 e representaram quase 17% dos óbitos de causa conhecida notificados em 2007 no Sistema de Informações sobre Mortalidade. Em 2005, de um total de 58 milhões de mortes ocorridas no mundo, o câncer foi responsável por 7,6 milhões, representando cerca de 13% de todas as mortes. É importante destacar que também foi reportado que do total desses óbitos, mais de 70% ocorreram em países de média ou baixa renda. Atualmente, estima-se que, em 2030, são esperados 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes e 75 milhões de pessoas vivas anualmente com câncer, sendo que o maior efeito desse aumento vai incidir sobre países de média e baixa renda.

Apesar de grandes avanços terem sido feitos no tratamento e controle da progressão de diversos tipos de câncer, deficiências significativas ainda permanecem. Como exemplo, pode ser citado o número de efeitos colaterais indesejados que ocorrem durante a quimioterapia. Outro problema de grande relevância são os vários tipos de câncer resistentes aos tratamentos atuais. Nesse sentido, tem sido discutida a importância das terapias naturais, uma vez que derivados vegetais possuem, em sua maioria, estrutura química complexa capaz de interagir com diferentes alvos nas células de mamíferos, o que poderia reduzir os efeitos indesejados das terapias atuais e mesmo culminar na descoberta de novas biomoléculas com potenciais mecanismos de ação contra o câncer.

O papel de produtos naturais como fonte de novos remédios tem sido reconhecido desde tempos ancestrais e, apesar do progresso científico e tecnológico, compostos derivados de produtos naturais ainda contribuem enormemente no campo de estudo que visa à descoberta de novas drogas. Do ponto de vista econômico deve ser mencionado que desde a validação farmacológica da planta medicinal até a produção de medicamentos, os gastos estimados e o tempo para sua disponibilização ao mercado consumidor seriam muito inferiores ao tempo e custo da produção de medicamentos sintéticos. Assim, a

utilização de plantas medicinais para produção de medicamentos constitui uma forma economicamente viável importante para países em desenvolvimento como o Brasil.

Finalmente, é importante ressaltar que a flora brasileira cada vez mais tem sido discutida como um interessante foco para prospectar novos químicos devido à sua diversidade de espécies e riqueza química associada. Particularmente, nos Campos Rupestres do estado de Minas Gerais, encontra-se um grande número de plantas do gênero *Lippia*, família Verbenaceae, que inclui espécies já descritas na literatura como possuidoras de potenciais compostos anticancerígenos para alguns tipos de tumores. Estes compostos estariam provavelmente relacionados aos terpenos, principais componentes dos seus óleos essenciais. Diferentes estudos têm demonstrado que o potencial anticancerígeno de alguns monoterpenos pode estar relacionado a genes codificadores de proteínas que são essenciais na transição das fases do ciclo celular. Esses genes são bons candidatos já que a desregulação do ciclo celular está fortemente relacionada à genética do câncer. Contudo, as vias moleculares de ação dos terpenóides como agentes anticancerígenos ainda não foram completamente caracterizadas.

Na década de 90, uma nova classe de RNAs regulatórios foi descoberta, os microRNAs, pequenos RNAs que se ligam a mRNAs alvos impedindo sua tradução. Rapidamente, inúmeros novos microRNAs foram sendo identificados e têm ganhado importante destaque nas pesquisas relacionadas ao câncer. Eles podem agir provocando efeitos como os de genes supressores de tumor ou como oncogenes, ou seja, podem tanto inibir o crescimento de células tumorogênicas quanto estimular características tumorais em uma célula sadia. A detecção do perfil de expressão de microRNAs em células tumorais antes e após tratamento com determinado composto pode configurar uma importante chave no entendimento do mecanismo de ação deste potencial composto antitumoral.

O Laboratório de Genética do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) tem desenvolvido, há cerca de dez anos uma linha de pesquisa que visa o estudo de várias espécies do gênero *Lippia* e seu potencial medicinal. Faz-se importante destacar que, no Brasil, a maioria dos estudos de plantas do gênero *Lippia* têm sido realizados por este grupo, que vem sistematicamente coletando espécies desse gênero em diferentes regiões do Estado de Minas Gerais para compor o banco de germoplasma da UFJF. Desta forma, o

presente estudo visa contribuir para incorporar novas informações a esta linha de pesquisa no que diz respeito ao potencial anticancerígeno de espécies do gênero *Lippia*, o que configura um dado de grande relevância na pesquisa medicinal deste gênero.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1. O PROBLEMA DO CÂNCER NO BRASIL

O Brasil tem experimentado uma mudança na estrutura etária de sua população bastante acelerada, com um número de idosos passando de 3 milhões, em 1960, para 20 milhões em 2008 e devendo chegar a 44 milhões até 2050 (MOREIRA, 2003; VERAS, 2009). De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a expectativa de vida do brasileiro atingiu mais de 73 anos em 2009, compondo um contingente que superou a população de idosos de vários países europeus como França, Inglaterra e Itália, segundo estimativas das Nações Unidas (MINAYO, 2012). Associado ao envelhecimento da população verificou-se uma redução de enfermidades incidentes na infância e aumento na prevalência e incidência de doenças cardiovasculares, hipertensão arterial e diversos tipos de câncer. Cervi et al. (2005) avaliando a tendência da mortalidade por doenças neoplásicas em 10 capitais brasileiras observaram maiores valores de mortalidade por neoplasia para indivíduos com mais de 60 anos. Basílio e Mattos (2008) reportaram um aumento na incidência de câncer de cólon/reto, pâncreas, pulmão e mama em mulheres acima de 60 anos no período de 1980 a 2005, nas regiões Sul e Sudeste.

Outra alteração relevante que tem ocorrido no Brasil seriam as modificações no padrão alimentar, que têm papel importante na determinação de risco de neoplasias. Sichieri et al. (1996) reportaram que a ingestão energética excessiva está associada positivamente ao aumento do risco de câncer de cólon, pulmão e esôfago e o aumento do consumo de alimentos ricos em gordura está associado ao aumento do risco de câncer de cólon. Neves et al. (2006) investigando a mortalidade por câncer de cólon e reto e consumo alimentar em diferentes capitais brasileiras observaram uma associação direta entre o consumo de óleos/gorduras e carnes e as taxas de mortalidade por esse tipo de câncer.

Também é importante mencionar que estudos têm mostrado que, no Brasil, existe uma variação regional para a taxa de mortalidade por câncer. Wünsch Filho e

Moncau (2002) analisando a mortalidade por câncer no Brasil de 1980 a 1995 observaram que o risco de morte por câncer foi maior nas regiões Sul e Sudeste. Esse dado foi concordante com um estudo no qual Cervi et al. (2005) observaram que as capitais das regiões Sul e Sudeste apresentaram maior grau de mortalidade por neoplasia quando comparadas às capitais das regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste.

Em 2011, o Instituto Nacional do Câncer publicou estimativas para 2012, válidas também para 2013, sobre a incidência de câncer no Brasil, relatando que são esperados 518.510 novos casos de câncer, sendo 257.870 casos novos para o sexo masculino e 260.640 para o sexo feminino. Foi estimado também que o tipo de câncer mais incidente na população brasileira será o câncer de pele tipo não melanoma (134 mil casos novos), seguido pelos tumores de próstata (60 mil), mama feminina (53 mil), cólon e reto (30 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (18 mil). As estimativas apresentadas também corroboram as observações destacadas anteriormente de que as regiões Sul e Sudeste apresentam as maiores taxas brutas de incidência. Diante desse cenário, fica evidente a necessidade de contínuo investimento no desenvolvimento de ações para o controle e tratamento do câncer.

O tratamento do câncer é realizado atualmente de três maneiras principais, através da quimioterapia, da radioterapia e da remoção cirúrgica. Muitas das drogas utilizadas em tratamentos quimioterápicos têm seus compostos de ação originados de plantas medicinais, tais como Oncovin (sulfato de Vincristina; *Vinca rosea*), Navelbine (*vinorelbina*; *Catharanthus roseus*), Oncosideo (etoposideo; *Podophyllum peltatum*) e Taxol (paclitaxel; *Taxus brevifolia*). Novas drogas anticancerígenas têm sido pesquisadas a partir de metabólitos secundários de vegetais ou de derivados sintéticos, sendo este um importante ramo de pesquisas no combate ao câncer, especialmente no Brasil, que detém uma ampla diversidade vegetal (LEE, 1999; KINGHORN et al 1999).

2.2. CICLO CELULAR, APOPTOSE E O CÂNCER

A replicação do DNA permite a herança precisa da informação genética de uma geração celular para a outra. A execução desse processo é dependente de uma série de mecanismos protéicos que configuram o ciclo celular. Dois momentos consecutivos podem ser caracterizados, a mitose, na qual ocorre a segregação de cromossomos replicados em duas novas células (dividida nas fases prófase, metáfase, anáfase e telófase) e a intérfase, período entre duas mitoses (VERMEULEN, VAN BOCKSTAELE e BERNEMAN, 2003; TACHIBANA, GONZALEZ e COLEMAN, 2005). Esses dois momentos podem ser separados em cinco fases que caracterizam o ciclo celular, G0, G1, S, G2 e M. A fase da mitose, M, é precedida por uma fase de preparação (intérfase), que inclui as etapas G0, G1, S e G2. A fase G1 (*gap 1*) é um estágio de preparação da célula para a fase seguinte, onde ocorre a síntese do DNA (fase S), que é, então, seguida de G2, fase preparatória para a mitose. A grande maioria das células é capaz de se dividir, mas o fazem, principalmente, para reparar danos ou para substituir células mortas. As células em G1, antes de seguirem para a replicação do DNA, podem sair do estágio de ciclo e entrar em um estado não proliferativo, chamado G0, por já estarem em fase terminal de diferenciação ou por entrarem em senescência. Nesta fase está a maioria das células não proliferativas de partes que não estão em crescimento no corpo (CERVEIRA, BIZARRO e TEIXEIRA, 2012).

A progressão através do ciclo celular é impulsionada através da família das quinases dependentes de ciclina (CDK) e os seus ligantes regulatórios, as ciclinas. Em mamíferos a ciclina D-CDK4, a ciclina D-CDK6 e a ciclina E-CDK2 conduzem a progressão de G1 através do ponto de restrição, o que permite a célula completar a fase. A fase S é iniciada pela ciclina A-CDK2. A ciclina B-CDK1 regula a progressão através de G2 e, bem como a ciclina A-CDK1, promove a entrada na mitose. A progressão através de cada fase e a transição de uma fase para outra são monitoradas por mecanismos sensores chamados *checkpoints*, que mantêm a ordem correta dos eventos. Se fatos aberrantes ou incompletos são detectados, como danos ao DNA, por exemplo, a via de *checkpoint* transporta sinal para efetores que podem disparar uma parada do ciclo celular até que o problema seja resolvido.

Proteínas efectoras são os inibidores de CDKs (CDKIs), que podem reversivelmente parar a progressão do ciclo celular. Paradas em G1 podem ser induzidas pela ativação da família InK4 [INK4A (p16), INK4B (p15), INK4C (p18) e INK4D (p19)] que inibem CDK4 e CDK6 ou pela via dos inibidores da família Cip/Kip (p21, p27, p57), que suprimem a atividade de CDK2. O ciclo celular é ativado por sinais externos, como fatores de crescimento ou hormônios que ativam múltiplas vias de transdução de sinais, como aquelas sob ação dos genes MYC e RAS. Muitas proteínas necessárias ao ciclo celular podem ser expressas pela ação do gene RB1. Durante toda a fase G1, a proteína RB1 é fosforilada pelo complexo ciclina D1-CDK4. RB1 fosforilada libera suas proteínas ligantes reguladoras, como a E2F1, que podem então induzir a expressão de ciclina E, por exemplo, e mais de outros 30 genes, cujos produtos são necessários para a transição G1-S. Já as paradas do ciclo celular em resposta a danos no DNA são mediadas através do gene TP53 (p53), cujos níveis estão sob regulação negativa da proteína MDM2 (Figura 1) (WILLIAMS e STOEBER, 2012; CERVEIRA, BIZARRO e TEIXEIRA, 2012).

O câncer pode ser descrito como um produto de variadas disfunções da regulação do ciclo celular em que injúrias e mutações gênicas, que em condições normais levariam à morte, são permitidas, sendo, então, o ciclo celular concluído e desta forma, mutações acumuladas. Podem ser destacadas como principais marcas da organização tumoral, a manutenção de sinalização proliferativa, a evasão de supressão de crescimento, a resistência à morte celular, a capacidade de passar à próxima geração a condição replicativa alterada, a indução da angiogênese e a ativação de invasão e metástase. As mutações que levam a estas condições ocorrem principalmente em proto-oncogenes e genes supressores de tumor. Proto-oncogenes codificam fatores de transcrição que regulam a expressão de proteínas transdutoras de sinal que estimulam a divisão celular e de outros reguladores que conduzem a célula através do ciclo. Eles têm papel crucial no funcionamento normal da célula, mas podem ser convertidos em oncogenes por mutação de ganho de função. Proteínas que eram expressas de forma mais elevada apenas em algum momento do ciclo celular, passam, no entanto, a não ter mais sua ação enfraquecida quando necessário. Um exemplo são as anormalidades que afetam as CDKs e ciclinas, que têm sido observadas em ampla gama de tumores. Kim et al. (1999) e Malumbres e Barbacid (2007), por exemplo, relataram CDK2, CDK4 and CDK6 superexpressas em tumores malignos como sarcomas, câncer de mama, linfoma,

melanoma e câncer colorretal. Os genes supressores de tumor codificam proteínas que inibem a proliferação ou induzem a morte celular em processo normal de resposta a danos no DNA ou a sinais de supressão do crescimento. Quando esses genes supressores de tumor sofrem uma mutação de perda de função, conseqüentemente desregulam o ciclo celular com a redução ou perda de função dessas proteínas supressoras. Como exemplo desta anormalidade, alterações em proteínas como a RB1 e TP53 (p53) têm sido observadas em células tumorais. Por exemplo, o gene CDKN2A (p16) está alterado em grande percentual de cânceres humanos. Conforme descrito por Liu et al. (1995) e Caldas et al. (1994) p16 está inativado por mutação ou deleção em melanoma herdado e adenocarcinoma pancreático. A proteína CDKN2A é inibidor específico de complexos ciclina D-CDK, impedindo a degradação dependente de fosforilação da proteína RB1 e, conseqüentemente, a transição G1-S. Logo, células com CDKN2 anormal não estão impedidas de avançar a fase G1 em caso de disfunção, levando a uma progressão de ciclo celular com ausência de checagem. (FOSTER, 2008; HANAHAN e WEINBERG, 2011; CERVEIRA, BIZARRO e TEIXEIRA, 2012).

A apoptose e os genes que a controlam têm profundo efeito no fenótipo maligno. Como já citado, algumas mutações em oncogenes comprometem a apoptose o que pode conduzir a uma iniciação tumoral, progressão ou metástase. Sabe-se também que a maioria dos agentes citotóxicos anticâncer induz a apoptose, mas os defeitos nos processos apoptóticos podem contribuir para falhas em tratamentos. Desta forma, muitas pesquisas têm focado esforços na compreensão desses mecanismos no câncer para produzirem novas estratégias terapêuticas (LOWE e LIN, 2000).

A morte celular programada inclui os processos de apoptose, autofagia e necrose programada e possuem mecanismos e funções que os diferem. Já a necrose diferencia-se dos processos de morte celular programada por ser uma morte catastrófica, cuja perda da integridade da membrana celular resulta na liberação de conteúdos citoplasmáticos para o tecido adjacente, promovendo o envio de sinais quimiotáticos. Como resultado pode haver eventual recrutamento de células inflamatórias, o que compromete as células vizinhas saudáveis. Destacando a apoptose, pode-se caracterizá-la por mudanças morfológicas específicas, como o encolhimento celular, a condensação e fragmentação nuclear, a formação de bolhas membranosas e a perda de adesão às células vizinhas ou da matriz extracelular.

Mudanças bioquímicas incluem a clivagem do DNA cromossômico em fragmentos internucleossomais, a externalização de fosfatidilserina e uma série de clivagens de substratos intracelulares por proteólises específicas. A apoptose acontece através de uma cascata de eventos energeticamente dependentes. Existem duas principais vias apoptóticas, a via extrínica ou do receptor de morte e a via intrínseca ou mitocondrial, mas existem algumas evidências de que ambas estão relacionadas e que moléculas de uma podem influenciar na outra. De qualquer forma as duas vias convergem para uma mesma execução da apoptose, que se inicia com a clivagem da caspase-3. Uma vez ativada, outras pró-caspases são também ativadas levando à iniciação de uma cascata de proteases. Esta cascata proteolítica amplifica o sinal apoptótico culminando em uma rápida morte celular. As células tumorais podem adquirir resistência à apoptose pela expressão de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 ou pela baixa expressão ou mutação de genes codificadores de proteínas pró-apoptóticas como a Bax. A expressão de Bcl-2 e de Bax é regulada pelo gene supressor de tumor p53, que é o gene mais amplamente observado com alterações na tumorigênese humana. Desta forma estas proteínas tornam-se potenciais candidatas para a ação de novos compostos pesquisados para o combate ao câncer (OUYANG et al., 2012; ELMORE, 2007).

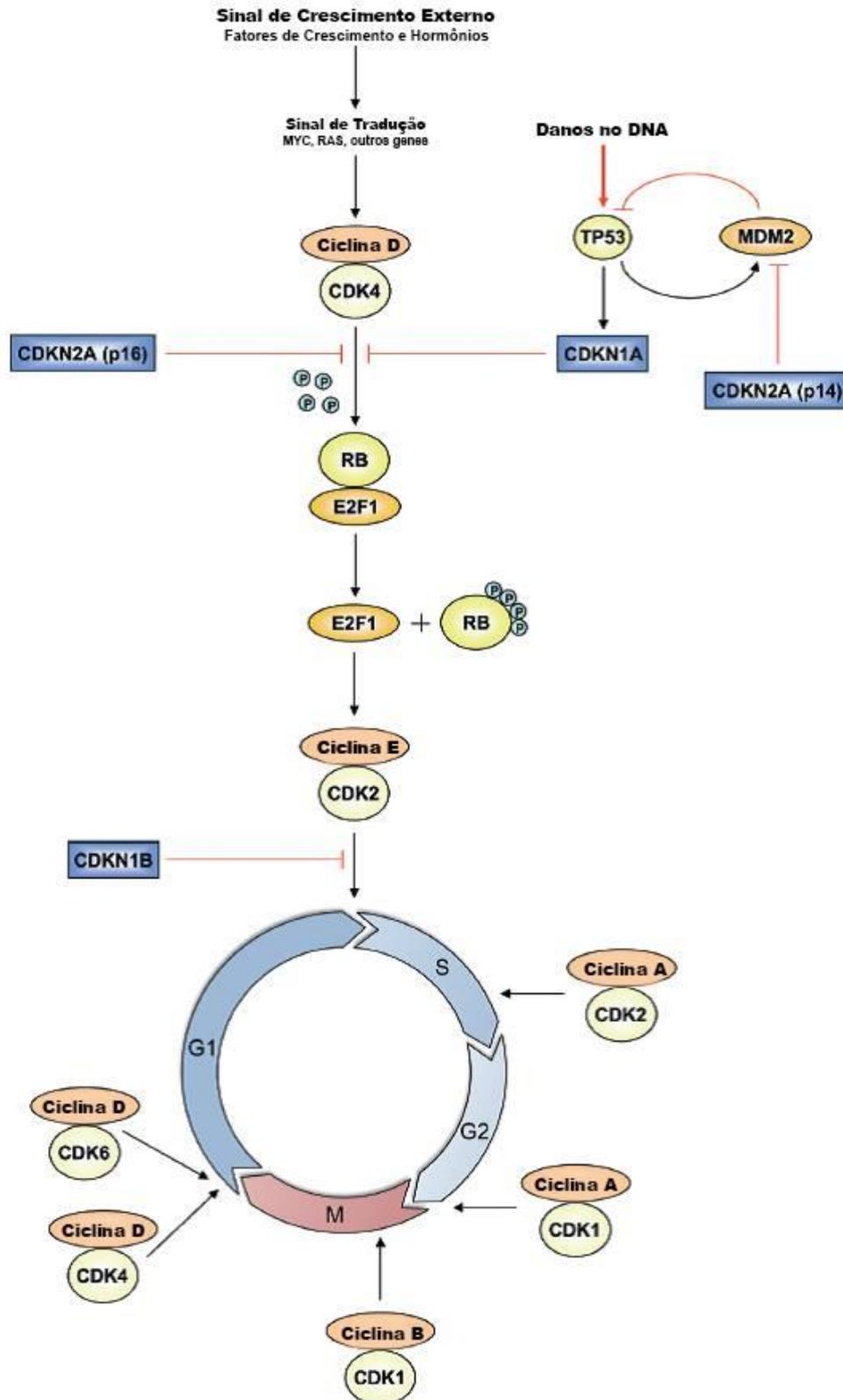


Figura 1. Mecanismos do ciclo celular. O ciclo celular é disparado por fatores de crescimento externo que levam à transdução de sinais a partir da ação de genes como MYC e RAS, que conduzem à síntese de ciclina D que se liga à CDK4 e que na ausência de inibição por p16 ou p53 é capaz de fosforilar a proteína RB. O regulador E2F1 pode ser então liberado, induzindo a ligação de ciclina E-CDK2, que atua na transição da fase G1-S. Toda a progressão e transição de fases do ciclo celular são reguladas pelos complexos ciclina-CDKs e pelos inibidores de CDKs (adaptada de CERVEIRA, BIZARRO e TEIXEIRA, 2012).

2.3 O GÊNERO *Lippia*

2.3.1 Caracterização, distribuição e potencial medicinal

O gênero *Lippia* pertence à família Verbenaceae e inclui aproximadamente 200 espécies encontradas na forma de ervas, arbustos e pequenas árvores (SANDERS, 2001). As várias espécies desse gênero encontram-se principalmente distribuídas em países das Américas Central e do Sul e em territórios da África Tropical (TERBLANCHÉ e KORNELIUS, 1996). O Brasil é uma das regiões de maior biodiversidade do mundo e uma das principais zonas de crescimento e diversificação de plantas do gênero *Lippia*, contendo aproximadamente 75% de suas espécies. Particularmente, nos Campos Rupestres do Estado de Minas Gerais, encontra-se um grande número dessas plantas (SALIMENA-PIRES, 1991, VICCINI et al., 2004, VICCINI et al., 2006).

Várias espécies do gênero *Lippia* fazem parte de uma lista de plantas medicinais e aromáticas que encontram-se ameaçadas de extinção, o que não somente as coloca como prioritárias para conservação como também reforça a necessidade de estudos mais detalhados de seu potencial medicinal (VIEIRA, 1999). Pascual et al. (2001a) publicaram uma revisão detalhada dos vários usos medicinais de diversas espécies do gênero *Lippia*. As espécies de *Lippia* têm sido comumente utilizadas no tratamento de problemas respiratórios, sendo também utilizadas para o tratamento de problemas gastrointestinais. Adicionalmente, existem estudos mostrando o uso de plantas desse gênero no tratamento de doenças hepáticas, infecções cutâneas, queimaduras, úlceras, diarreia, gonorréia entre outras (MORTON, 1981, GIRON e CÁRCERES, 1994, di STASI et al, 1994, PASCUAL et al., 2001b, TAVARES et al., 2005).

Entre as espécies de *Lippia* mais bem estudadas, encontra-se a *Lippia alba*. No Brasil, o nome popular mais comum dessa planta é erva-cidreira, mas também é conhecida como erva-cidreira-do-campo, falsa-melissa e outros (LORENZI e MATOS, 2002). Essa espécie ocorre em praticamente todas as regiões do país (MOLDENKE, 1965), e seu uso na medicina popular brasileira é amplamente

difundido. Vários estudos demonstraram que essa espécie apresenta atividade antibacteriana e antifúngica. Dentre os micro-organismos estudados, o óleo essencial de *L. alba* mostrou atividade contra *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus mutans*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichophyton rabrum*, *Trichophyton mentagrophyte*, *Neurospora crassa*, *Dreschlera oryzae*, *Fusarium moniliforme*, *Fonsecaea pedrosoi* e várias espécies de *Candida*, incluindo *Candida albicans* (CACERES e GIRON, 1987, GRAINGE e AHMED, 1988, DUARTE et al., 2005 e OLIVEIRA et al., 2006). Estudos também têm demonstrado que extratos brutos de *L. alba*, obtidos por acetato de etila, têm atividade antiviral. Andrighetti-Fröhner et al. (2005) demonstraram que extratos dessa espécie inibem o vírus *Herpes simplex* tipo I e têm atividade contra poliovírus.

Durante os últimos anos, vários estudos têm demonstrado que os radicais livres estão entre os modificadores de DNA mais amplamente distribuídos dentro das células, e devido ao seu envolvimento com câncer, existe crescente preocupação mundial na procura de novos antimutagênicos antioxidantes. Portanto, é importante mencionar que Ramos et al. (2003) reportaram atividade antioxidante de *L. alba*, indicando que essa planta medicinal pode ser alvo para a procura de biomoléculas antimutagênicas, o que é essencial no caso de tumores altamente resistentes à quimioterapia.

Outra espécie bem estudada é *L. sidoides*. O óleo essencial dessa espécie exibiu atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium smegmatis* e contra patógenos orais importantes no desenvolvimento de cáries e doenças periodontais (LEMOS et al., 1990, COSTA et al., 1998, BOTELHO et al., 2007). Além dessas, foram observadas atividades antifúngica e antiespasmódica (BRITO e BRITO, 1993 e HUTCHINGS e VAN STADEN, 1994), como também ação inibitória no crescimento e alterações morfológicas sobre promastigotas de *Leishmania chagasi* (OLIVEIRA et al., 2009). Também exibiu atividade contra larvas de *Aedes aegypti*, principal vetor da dengue. (CARVALHO et al., 2003). Outro uso reportado recentemente foi o auxílio no aumento da permeabilidade de droga sobre a pele (BRITO et al., 2009). Finalmente, é importante destacar que, como para *L. alba*, também foi observada atividade antioxidante para *L. sidoides*. Monteiro et al. (2007) demonstraram atividade antioxidante do óleo essencial dessa espécie.

Ainda outra espécie de *Lippia* cuja atividade antioxidante foi reportada apenas recentemente foi *L. salviifolia*. Silva, 2008 demonstrou que extratos etanólicos de folhas secas de *L. salviifolia* apresentam elevada atividade antioxidante *in vitro*, assim esses resultados também colocam essa planta como uma das espécies do gênero *Lippia* alvo para a procura de biomoléculas antimutagênicas.

No Brasil, a maioria dos estudos farmacológicos vem sendo realizados com as duas primeiras espécies de *Lippia* supracitadas, sendo escassos estudos com as espécies nativas do país. Apenas em 2006, Leitão et al. demonstraram que *L. lacunosa* e *L. rotundifolia*, espécies nativas do Brasil, apresentam atividade antimicobacteriana *in vitro* contra *Mycobacterium tuberculosis*, causadora da tuberculose. É necessário mencionar que essa doença ainda é um problema grave de saúde em muitas regiões do mundo, especialmente no Brasil.

2.3.2 Terpenos e a ação de compostos com potencial antitumorogênico

As plantas produzem compostos não utilizados diretamente para o seu crescimento ou desenvolvimento que são conhecidos como metabólitos secundários. Suas funções têm sido associadas à proteção contra herbivoria ou infecções, atração de polinizadores e dispersores e como agentes de competição. Desde o final do século XIX, há interesse na utilização destes compostos como fármacos, fragrâncias e materiais industriais (CROTEAU et al., 2000). Os compostos de *Lippia* com atividades farmacológicas estão provavelmente relacionados ao metabolismo secundário destas plantas, mais especificamente aos seus óleos essenciais (PASCUAL et al., 2001a).

Os metabólitos secundários podem ser divididos em três grupos: terpenos, fenóis e alcalóides. Os terpenos são estruturalmente uma das classes mais variadas, sendo constituintes majoritários de óleos essenciais. São sintetizados a partir do metabolismo primário através da via do ácido mevalônico ou da via do metileritritol fosfato, através das quais é formada uma molécula de isopentenil pirofosfato (IPP) ou o seu isômero dimetialil pirofosfato (DMAPP) (Figura 2). O IPP é a molécula ativa composta por cinco carbonos e unidade estrutural de todos os terpenos. O IPP e o DMAPP condensam-se originando geranil pirofosfato (GPP), o

precursor C10 dos monoterpenos. O GPP pode ligar-se a outra molécula de IPP, dando origem a um composto C15, o farnesil pirofosfato (FPP), precursor dos sesquiterpenos. A adição de uma nova molécula de IPP origina um composto C20, o geranylgeranyl pirofosfato (GGPP), precursor dos diterpenos. Finalmente, a dimerização do FPP e do GGPP origina triterpenos (C30) e tetraterpenos (C40) respectivamente (Figura 2) (MC GARVEY e CROTEAU 1995; BOHLMANN et al 1998; DUBEY et al., 2003).

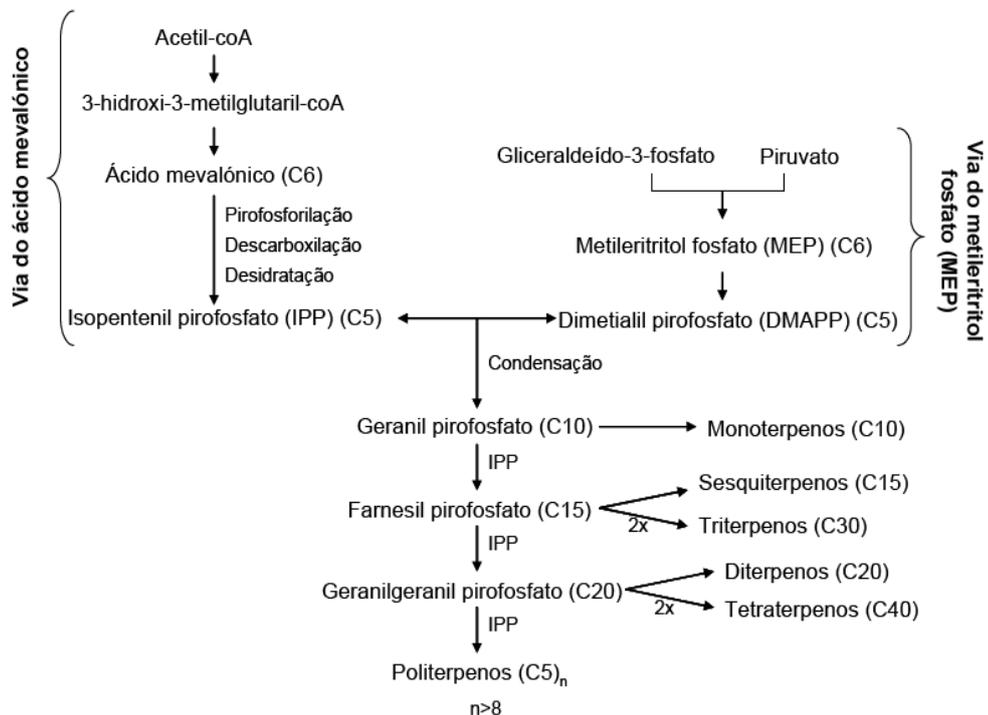


Figura 2. Biossíntese dos terpenos. Os terpenos podem ser sintetizados a partir do metabolismo primário da via do ácido mevalônico ou da via do metileritritol fosfato que originam respectivamente o isopentenil pirofosfato (IPP) ou o seu isômero dimetialil pirofosfato (DMAPP). A condensação do IPP e do DMAPP gera o geranyl pirofosfato (GPP), precursor dos monoterpenos de 10 carbonos. Novas adições de IPP ao GPP originam os demais terpenos com maior número de carbonos (extraída de MENDES, 2007).

Os monoterpenos destacam-se como os principais terpenos constituintes de óleos essenciais e dependendo do componente majoritário, as plantas de uma mesma espécie podem ser classificadas em diferentes quimiotipos (PASCUAL et al., 2001a). A primeira monoterpeno sintase clonada em plantas, especificamente em *Mentha spicata*, foi a limoneno sintase, responsável pela síntese do mais simples dos monoterpenos cíclicos derivado de GDP, o limoneno (COLBY et al., 1993). Por sua vez, o limoneno serve como precursor para outros monoterpenos, como

carvona, mentol, álcool perila e perilaldeído (KARPet al., 1990;MCGARVEY e CROTEAU 1995). A enzima que converte GDP em linalol, a linalol sintase (LIS), é uma das terpeno sintases mais bem caraterizadas, sendo que o primeiro estudo a reportar a clonagem do gene codificador dessa enzima foi realizado por Dudareva et al. (1996). Posteriormente foi reportado em *Ocimum basilicum*, rico em citral, a clonagem do gene codificador da enzima que sintetiza geraniol a partir de GDP, a geraniol sintase-GES (IIJIMA et al., 2004).

Vários estudos têm sugerido que os monoterpenos podem representar uma nova classe de agentes a serem usados na prevenção do câncer, o que é especialmente importante nos casos de tumores altamente resistentes a quimioterapia e também para minimizar os efeitos indesejados das drogas usadas nos tratamentos atuais. Crowell (1999) publicou ampla revisão sobre a atividade antitumoral de monoterpenos e relatou que o monoterpeno limoneno tem essa atividade já bem estabelecida, inibindo o desenvolvimento de vários tipos de câncer, como câncer de mama, de pele, de fígado, de pulmão e de estômago. Além do limoneno, outros monoterpenos com atividade antitumoral já demonstrada são carvona, carveol, mentol, álcool perila, citral e timol (CHAOUKlet al., 2009; MASTELIC et al. 2008; HE et al., 1997). Ainda com relação aos monoterpenos e seu potencial antitumoral, Shoff et al. (1991) demonstraram que o monoterpeno geraniol reduz o crescimento de linhagens celulares de leucemia e melanoma e que a sobrevivência de camundongos após a transferência de linhagens celulares de leucemia é prolongada por dieta contendo geraniol. Adicionalmente, outros autores demonstraram que o geraniol sintético possui atividade terapêutica *in vitro* e *in vivo* para uma ampla variedade de tipos de câncer, incluindo hepatoma e câncer pancreático, para os quais existe pouco sucesso terapêutico e câncer de intestino, que é altamente resistente a quimioterapia (YU et al., 1995; BURKE et al., 1997; DUNCAN et al.,2004; CARNESECCHI et al., 2001 e 2002; ONG et al.,2006; WISEMAN et al., 2006).

Os sesquiterpenos também são encontrados em óleos essenciais, mas de maneira menos expressiva que os monoterpenos. No entanto, sesquiterpenos obtidos de diferentes espécies de plantas também têm demonstrado efeito citotóxico sobre linhagens celulares tumorais de cólon, mama, pulmão, melanoma e ovário e mesmo efeito antimetastático em modelo de tumor pulmonar em camundongos (GU

et al., 2002; KIRANA et al. 2003; LEE et al. 2005; PARK et al. 2006; CHOI et al. 2004).

Os sesquiterpenos têm sido pouco estudados com relação ao seu potencial antitumor, no entanto para farnesol tem-se observado efeitos de indução de parada de ciclo celular e apoptose em diversos tipos de linhagens de células tumorais, além de inibição da tumorigênese em alguns modelos animais, funcionando assim, de maneira quimiopreventiva *in vivo* (CHAGAS et al. 2009; RIOJA et al., 2000; WISEMAN et al., 2007; ONG et al., 2006). O efeito antiproliferativo de trans-nerolidol foi testado em linhagens tumorais de mama e cólon, mas exibiu baixa inibição (SUN et al. 2010).

Apesar de estudos terem demonstrado o potencial anticancerígeno dos mono e sesquiterpenos, deve ser ressaltado que suas vias moleculares de ação ainda não foram completamente determinadas. Como exemplo, pode ser citado que estudos anteriores sugeriram que a inibição da prenilação de proteínas, como as proteínas Ras, pelos monoterpenos, poderia estar relacionada à sua atividade anticancerígena. Contudo, estudos recentes têm sugerido que o principal alvo dos monoterpenos não seriam as proteínas Ras (CROWELL, 1999).

Adicionalmente, Wiseman et al. (2007) sugeriram que o efeito do geraniol e do farnesol na prevenção de câncer pancreático ocorre através da indução de p21^{cip1} e p27^{kip1}, inibidores do ciclo celular. Contudo para câncer de mama, nenhuma mudança na expressão de inibidores do ciclo celular foi observada (DUNCAN et al., 2004). Já Kim et al. (2011) observaram que geraniol induziu parada de ciclo celular e apoptose em células prostáticas cancerosas PC-3 em cultura e *in vivo*. Também modulou a expressão de vários reguladores do ciclo celular, reduzindo a expressão de ciclinas A, B, D e E, de CDK1 e CDK4 e de Bcl-2 e elevando a expressão de p21, p27 e Bax. Ong et al. (2006) analisando o efeito quimiopreventivo também de geraniol e farnesol, mas sobre neoplasia hepática em ratos, detectaram que ambos reduziram a lesão pré-neoplásica hepática, bem como a proliferação celular nesta lesão e o dano ao DNA. Apenas geraniol aumentou a apoptose na área da lesão. Foi detectado efeito apenas de farnesol inibindo a incidência e o número de nódulos hepáticos por animal, reduzindo os níveis totais de colesterol plasmático e aumentando os níveis hepáticos do RNAm da HMG-CoA redutase. Estudos anteriores detectaram que farnesol e geraniol diminuem a proliferação celular porque inibem pós-transcricionalmente a atividade da enzima HMG-CoA redutase, com

consequente redução na síntese de colesterol e intermediários da via do mevalonato, que são importantes para a farnesilação e geranilgeranilação protéica de certos proto-oncogenes. Diferentemente das células normais, aquelas nas lesões pré-neoplásicas e neoplásicas do fígado perdem o mecanismo de regulação transcricional decrescente da HMG-CoA redutase por estero e colesterogênese. No entanto, nestas lesões, esta enzima retém a sensibilidade à inibição mediada por isoprenóides (MO e ELSON, 2004; MCANALLY et al. 2003; GREGG et al. 1986).

Finalmente, estudos recentes têm fornecido fortes evidências que indicam que certos agentes anticancerígenos geram *reactive oxygen species* (ROS) que iniciam uma tradução de sinal que culmina na inibição do ciclo celular e/ou morte celular programada (ANTOSIEWICZ et al., 2008). Essa produção de ROS pelo farnesol já foi observada em leveduras (MACHIDA et al. 1998; MACHIDA e TANAKA 1999). Joo e Jetten (2010) revisaram mecanismos de ação do farnesol. Destacaram que sua regulação se dá também através da enzima fosfocolina citidililtransferase α , que atua na síntese de fosfatidilcolina. Em alguns tipos celulares a ação é mediada através de receptores nucleares, incluindo a ativação do receptor farnesóide X (FXR) e dos receptores ativadores da proliferação de peroxissomos. Também foi descrito que farnesol promove a indução de estresse de retículo endoplasmático e subsequente ativação de erro no dobramento protéico, tendo, assim, um crítico papel na indução da apoptose em células de carcinoma de pulmão. Essa indução é dependente da ativação das vias MEK 1/2- ERK 1/2 (JOO et al. 2007).

2.4 MicroRNAs E CÂNCER

Os microRNAs (ou miRNAs) maduros são pequenas moléculas de fita simples de RNA com aproximadamente 20 a 23 nucleotídeos que controlam a expressão gênica em muitos processos celulares. Foram inicialmente descritos, há pouco mais de 20 anos, com a identificação dos miRNAs lin-4 e let-7 como controladores do desenvolvimento de *Caenorhabditis elegans*. Os microRNAs são frequentemente expressos como um transcrito policistrônico e diversos deles se encontram em *clusters* no genoma e são co-expressos. O microRNA maduro é obtido de um

processo com várias etapas. É extraído do primeiro transcrito, o pri-miRNA, que contém um ou mais *hairpins* precursores com 70 nucleotídeos, através de promotores próprios ou divididos com genes em codificação (Figura 3). Essa estrutura com *hairpins* é reconhecida no núcleo pela DGCR8, uma proteína de ligação a RNA de fita dupla (dsRBP), ligada à RNASEN, também chamada de Drosha e o pre-miRNA é produzido. Essas moléculas são então transportadas para o citoplasma pela exportina 5, onde são processadas pela Dicer em complexo com a dsRBP TRBP e/ou PRKRA para produzir um RNA intermediário de fita dupla, composto pelo microRNA maduro e uma sequência complementar. Enquanto o microRNA maduro é carregado dentro da proteína Argonauta/EIF2C, que forma o core do complexo ribonucleoproteína contendo miRNA (miRNP), ou pode formar também um complexo referido como complexo silenciador induzido por microRNA (miRISC), a sequência complementar é liberada e degradada. Esse complexo que contém proteínas da família das argonautas medeiam o reconhecimento do RNAm alvo. Este RNAm alvo é reconhecido principalmente pelo pareamento do microRNA à sequência complementar localizada principalmente na região 3'UTR, mas também em regiões codificantes. Os miRNPs conduzem a uma desestabilização do RNAm alvo de diversas maneiras, como *decapping* e desadenilação, já os miRISC promovem a clivagem do RNAm alvo (Figura 3) (VENTURA E JACKS, 2009; FARAZI et al., 2011).

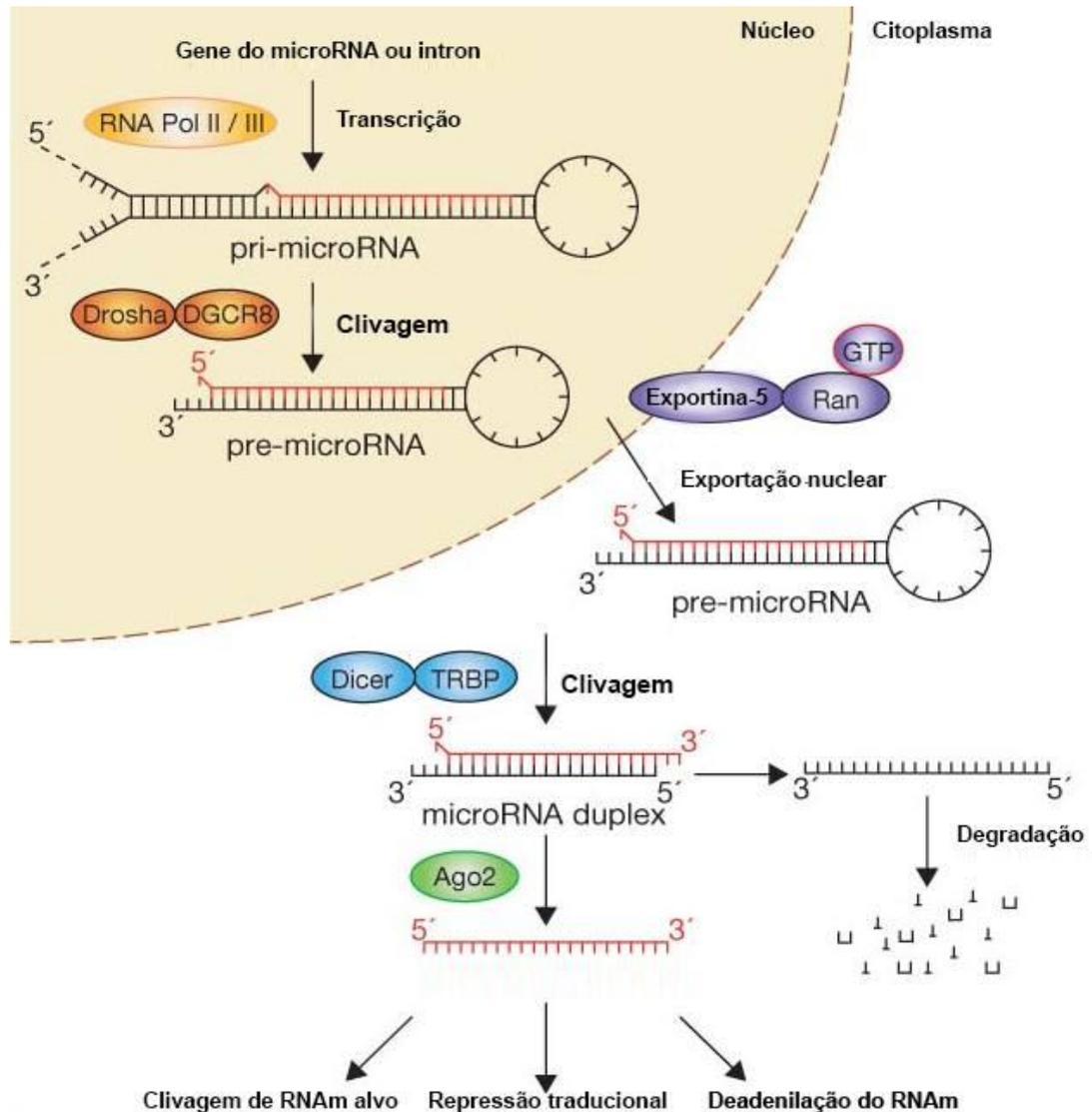


Figura 3. Biogênese dos microRNAs. O transcrito gerado pela RNA polimerase II, pri-microRNA é clivado pelo complexo Drosha/DGCR8 formando o *hairpin* pre-microRNA. A exportina 5 conduz a estrutura para o citoplasma onde DICER/TRBP geram o microRNA maduro ainda em fita dupla. Com a associação ao complexo protéico com argonautas uma fita é dragada e o microRNA maduro pode atingir seu RNAm alvo induzindo sua clivagem ou desestabilizações (adaptada de WINTER et al. 2009).

Com 21.264 entradas atualmente no banco de dados miRBase, os microRNAs vêm sendo ainda amplamente descobertos e pesquisados e, além disso, crescentes evidências indicam que essas moléculas são, de fato, reguladores chave de vários processos biológicos fundamentais. Devido a este papel regulatório, de diversas maneiras, os microRNAs podem afetar a tumorigênese. Muitos trabalhos têm mostrado que a expressão de miRNAs encontra-se desregulada em muitos tipos de câncer humano. Por exemplo, Johnson et al. (2005) demonstraram que a expressão do miRNA let-7c é mais baixa (*down-regulada*) em células de câncer de

pulmão do que em células não-tumorais, enquanto a proteína Ras teve seu nível significativamente aumentado. Esses resultados juntamente com a observação de que a região 3' não traduzida do RNAm de Ras contém múltiplos sítios complementares do miRNA let7c, sugerem que o este miRNA regula a proteína Ras. Como supracitado, alguns estudos identificaram a proteína como um potencial alvo dos monoterpenos, sendo assim indicada como responsável pela atividade anticancerígena desses compostos.

Cimmino et al. (2005) observaram que os miRNAs mir-15 e mir-16 quando deletados ou menos expressos em leucemia suprimem BCL2. Foi demonstrado que os miRNAs mir-17-5p e mir-20a controlam o balanço entre morte e proliferação celular regulando negativamente a expressão do E2F1, que é um dos promotores da progressão do ciclo celular, regulado pelo proto-oncogene c-Myc (O'DONNELL et al., 2005). A expressão ou função desregulada de c-Myc, é uma das anormalidades mais comuns em tumores humanos. Recentemente, Foekens et al. (2008) demonstraram que os miRNAs mir-7 e mir-516-3p estão significativamente associados com eventos relacionados ao ciclo celular em câncer de mama. O mir-7 relaciona-se à transição G2-M e o mir-516-3p às ciclinas e aos reguladores de ciclo celular, como p21^{cip1} e p27^{kip1}, inibidores de complexos ciclina-CDKs.

As alterações na expressão dos microRNAs em células tumorais estão relacionadas a diferentes fatores. Polimorfismos ou mutações, por exemplo, podem interferir no sítio de ligação alvo em RNAs. Foi observado um polimorfismo G>C na região 3' UTR de CD86 que reduziu a afinidade de ligação do microRNA mir-582, o que parece estar associado a um aumento no risco de desenvolvimento de câncer colorretal. Esses resultados podem ser explicados já que o aumento nos níveis de CD86 favorecem um microambiente inflamatório que predispõe a este tipo de câncer (AGOSTINI et al., 2010). As metilações também podem estar relacionadas às alterações no perfil de expressão dos microRNAs. Lujambio et al. (2008) demonstraram que o miR-124a encontra-se localizado próximo a uma ilha CpG e está metilado em tecidos com câncer de cólon e não metilado em tecidos de cólon normal.

Outro exemplo está relacionado a alguns estudos que realizaram transfecção de precursores de determinado microRNA deficiente em células tumorais e observaram efeitos relacionados à diminuição nos níveis das proteínas de seus mRNAs alvos. Michael et al. (2003) transfectaram o precursor de miR-143 em

células epiteliais cancerosas de cólon deficientes deste microRNA. Observaram, então, uma diminuição da proteína ERK5, sugerindo que o miR-143 inibe ERK5. De forma semelhante Akao et al. (2006) transfectaram let-7a-1 (precursor de let-7) em células da linhagem DLD-1 de câncer de cólon com baixos níveis de let-7 e uma significativa supressão do crescimento celular foi observada. Além disso, conforme relação destacada anteriormente, os níveis das proteínas RAS e c-myc foram reduzidos, mas a quantidade de seus mRNAs não mudou.

O microRNA let-7 foi o primeiro microRNA detectado como ativamente envolvido na formação de câncer, por isso existem tantos estudos demonstrando sua relação e a de outros microRNAs da mesma família nesta doença. Em melanoma, por exemplo, foi mostrado que o miRNA let-7b tem como alvos, de maneira direta e indireta, reguladores do ciclo celular. Mais uma vez, experimentos com este miRNA transfectado para células de melanoma demonstraram uma redução na expressão das ciclinas A, D1, D3 e na ciclina dependente de quinase CDK 4, desacelerando o ciclo celular, o que foi demonstrado por uma diminuição no número de células melanoma na fase S e um aumento do número de células na fase G1 (MUELLER e BOSSERHOFF 2009).

Levy et al. (2010), também em estudo relacionado a melanoma, reportaram que a supressão deste tipo de tumor não é mediada pela melastatina, que se acreditava ser supressora de tumor por ser *down*-regulada neste tipo de câncer, mas sim pelo microRNA miR-211 localizado dentro de um íntron do gene da melastatina. O aumento da expressão de miR-211 e não da melastatina reduziu a migração e a invasão de melanomas humanos caracterizados por baixos níveis de melastatina e miR-211.

Relacionado ao câncer de mama, Ma et al. (2010) mostraram que miR-9 encontra-se *up*-regulado em células deste tipo de câncer e tem como alvo o mRNA que codifica caderina E, levando, desta forma, a um aumento da motilidade e invasividade celular devido à diminuição desta proteína de adesão. Além disso, com essa diminuição de caderina E, tem-se como resultado a ativação da sinalização por β -catenina, o que contribui para um aumento na expressão do gene que codifica o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que leva, em parte, ao aumento da angiogênese tumoral.

Trabalhos recentes têm destacado o uso dos microRNAs em estratégias terapêuticas. Em revisão, Garzon et al. (2010) lista o uso dos microRNAs como

genes supressores de tumor, através de estratégias terapêuticas baseadas principalmente em vetores e drogas, e como oncogenes, através do uso de oligonucleotídeos *antisense* e drogas. Além disso, Komatsu et al. (2011) discute o uso de microRNA circulante no plasma de pacientes com câncer como um biomarcador para esta doença.

No Brasil, diferentes espécies de *Lippia* apresentam uma ampla diversidade de quimiotipos com potenciais medicinais já difundidos no país e encontram-se distribuídas em várias regiões, incluindo Minas Gerais. Para algumas já foi reportada potencial atividade anticancerígena, sendo vários dos monoterpenos efetivos contra tumores, componentes majoritários do óleo essencial dessas plantas. Assim, o gênero *Lippia* torna-se um excelente modelo para estudos que visam o melhor entendimento da relação entre os componentes de seus óleos essenciais e suas propriedades farmacológicas, especificamente no que se refere ao seu potencial anticancerígeno.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a potencial propriedade farmacológica como agente anticancerígeno dos compostos presentes no óleo essencial de cinco diferentes espécies do gênero *Lippia* (Verbenaceae).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar a composição do óleo essencial obtido de folhas de *L. alba* quimiotipos geraniol e carvona, *L. sidoides*, *L. salviifolia*, *L. rotundifolia* e *L. lacunosa*, para verificar a presença e quantidade de terpenos.

Avaliar a atividade do óleo essencial das cinco espécies de *Lippia* sobre a viabilidade celular de diferentes tipos de câncer: pele, cólon, mama e pulmão, que estão dentre os mais incidentes no Brasil.

Investigar a atividade do óleo essencial das cinco espécies de *Lippia* no bloqueio da transição de fases do ciclo celular em linhagens tumorais dos tipos de câncer supracitados.

Avaliar a morte celular causada com a ação dos óleos essenciais das espécies de *Lippia* sobre as referidas linhagens celulares através da identificação de apoptose.

Investigar os mecanismos moleculares de ação dos componentes do óleo essencial das espécies de *Lippia* com potencial anticancerígeno, através da expressão de microRNAs nas linhagens tumorais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL VEGETAL

Folhas frescas foram coletadas, pela manhã ou no final da tarde, em dias não chuvosos, de cinco espécies de *Lippia* - *L. alba* quimiotipos geraniol e carvona, *L. sidoides*, *L. salviifolia*, *L. lacunosa* e *L. rotundifolia* - da Estação Experimental localizada no campus da Universidade Federal de Juiz de Fora, MG (Figura 4). As coletas foram realizadas no período de outubro de 2009 a fevereiro de 2010 e de novembro a dezembro de 2010. Amostras dos espécimes de *Lippia* avaliados neste estudo estão depositadas no Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Juiz de Fora.

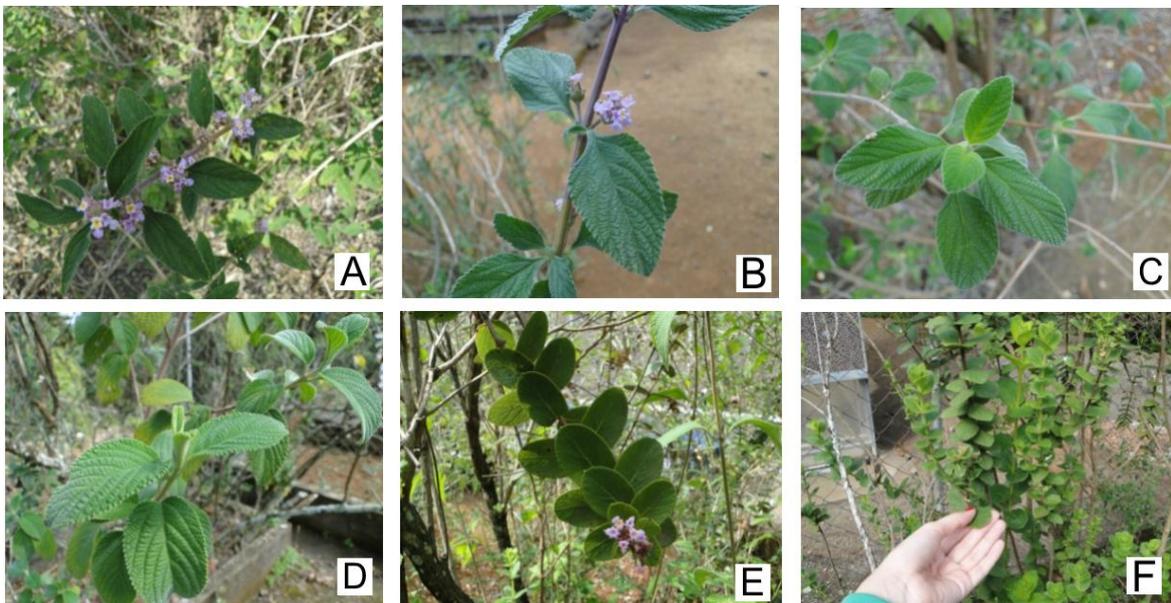


Figura 4. Fotos ilustrativas de *Lippia*. Espécimes de *Lippia* dos quais as folhas foram coletadas para a extração dos óleos essenciais. A: *L.alba* quimiotipo geraniol; B: *L. alba* quimiotipo carvona; C: *Lippia sidoides* D: *Lippia salviifolia*; E: *Lippia lacunosa* e F: *Lippia rotundifolia*

4.2 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

Os óleos essenciais das folhas frescas de cada espécie de *Lippia* foram obtidos separadamente por hidrodestilação por 2 horas em aparato do tipo Clevenger. Os óleos foram mensurados e alíquotas de 5mg de cada um foram armazenadas a -80°C em frascos selados cobertos por folha de papel alumínio. Para cada um dos ensaios realizados descritos a seguir, uma alíquota foi descongelada e dissolvida em DMSO (Sigma, St. Louis, MO, USA) a 4% formando uma solução trabalho de 1 mg/mL.

4.3 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA/ESPECTROMETRIA DE MASSA

A composição química dos óleos essenciais de cada espécie de *Lippia* foi determinada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa realizada em aparelho Shimadzu QP5050A, equipado com coluna PTE-5 Supelco (30m x 0,25mm x 0,25µm). O gás de injeção foi o nitrogênio (1 mL/min). A temperatura na coluna variou de 30°C a 250°C. A razão de *split* foi de 1:20 e a temperatura do injetor e a de interface foi de 250°C. O tempo total de análise foi 39,17 minutos com um fluxo de 19,8 mL/min. Índices de Kovats foram calculados a partir dos tempos de retenção gerados da análise de cada óleo em comparação à solução padrão de alcanos C₈-C₂₀ que foi analisada simultaneamente. Os componentes dos óleos foram determinados de acordo com comparações com o banco de dados de espectros Shimadzu e aqueles de Adams (1995). A quantidade de compostos foi definida pela integração da área dos picos dos espectrogramas.

4.4 LINHAGENS CELULARES E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Células das linhagens tumorais MeWo (melanoma de pele; *Homo sapiens*; cedidas pelo Dr. Ricardo R. Brentani, Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o câncer, SP), CT26.WT (carcinoma de cólon; *Mus musculus*; cedidas pela Dra. Lucíola Bastos do Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB/UFMG, Belo Horizonte), A549 (carcinoma de pulmão; *Homo sapiens*; obtidas do Banco de células do Rio de Janeiro); MDA MB-231 (adenocarcinoma de glândula mamária; *Homo sapiens*; cedidas pelo Dr. Ricardo R. Brentani, Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o câncer, SP); CACO-2 (adenocarcinoma colorretal; *Homo sapiens*; obtidas do Banco de células do Rio de Janeiro, UFRJ) e da linhagem normal utilizada como controle CHO-K1 (ovário; *Cricetulus griseus* – hamster chinês; obtidas do Centro Panamericano de Febre Aftosa, RJ) foram cultivadas em meio apropriado à 37°C em estufa com 5% de CO₂. Para MeWo, CT26.WT, MDA MB-231 e CHO-K1 utilizou-se meio RPMI 1640 pH 7,4 (Cultilab) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), 0,1 mg/mL de ampicilina, 0,1 mg/mL de kanamicina, 0,005 mg/mL de anfotericina, 0,2% de NaHCO₃ e 0,2% de HEPES (Sigma, St. Louis, MO, USA). Para A549 e CACO-2 utilizou-se meio DMEM (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 10% FBS, 0,1 mg/mL de kanamicina, 0,005 mg/mL de anfotericina e 0,37% NaHCO₃.

4.5 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE

A citotoxicidade de todos os seis óleos foi mensurada utilizando-se o ensaio colorimétrico por MTT [(brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (Sigma, St. Louis, MO, USA). Células de cada umas das seis linhagens citadas anteriormente foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de 2×10^3 células/poço em 100 µL de meio supracitado adequado para cada célula suplementado com 10% de FBS. Após 24 h de incubação a 37°C, as células foram novamente tratadas com meio adequado suplementado com 10% de FBS, mas

contendo também diferentes concentrações dos seis óleos essenciais separadamente. As soluções de trabalho de cada óleo essencial foram diluídas em quatro diferentes concentrações, 0,1 µg/mL, 1 µg/mL, 10 µg/mL e 100 µg/mL. Após 72 horas de incubação a 37°C, o meio foi descartado e 10 µL de solução (5 mg/mL em PBS) de corante tetrazólio (MTT) foi adicionado a cada poço. As células foram incubadas a 37°C por 4 h. O meio foi descartado e 100 µL de DMSO foram adicionados por cinco minutos para dissolver os cristais de formazina formados. A microplaca foi agitada lentamente por 5 min e lida em leitor de microplaca TP-reader (Thermoplate) a 540 nm. As amostras de controle negativo continham até 0,4% de DMSO, equivalente à porcentagem encontrada na maior concentração avaliada. As amostras de controle positivo continham 5-fluorouracila (5-FU), um análogo da pirimidina uracila e um dos mais antigos agentes anticâncer (Casale et al., 2004), em quatro diferentes concentrações 0,1 µM, 1 µM, 10 µM e 100 µM. O controle branco continha apenas meio suplementado com 10% de FBS. A cada placa, todas as amostras eram repetidas seis vezes e todos os ensaios de MTT foram realizados em diferentes experimentos independentes. A viabilidade celular foi calculada através da seguinte equação: $A/C \times 100$, sendo “A” a média aritmética das D.O.s de cada amostra e “C” a média aritmética das D.O.s observadas no controle negativo. Os valores da viabilidade celular foram utilizados para calcular a concentração que corresponde a 50% de morte celular (IC₅₀), através de regressão linear usando o software Sigma Plot 10.0 (Systat Software, Inc.).

Os valores de IC₅₀ puderam ser obtidos para quatro espécies de *Lippia* (*L. alba* quimiotipo geraniol: 50 µg/mL, *L. sidoides*: 19 µg/mL, *L. rotundifolia*: 36,3 µg/mL e *L. salviifolia*: 30,2 µg/mL), e foram utilizados para todos os experimentos subsequentes, a menos que indicado de outra maneira.

4.6 ANÁLISE DO CICLO CELULAR

O efeito dos óleos essenciais sobre o ciclo celular foi avaliado apenas para aquelas linhagens e óleos essenciais selecionados após o ensaio de citotoxicidade (IC₅₀ obtidas e inibição celular acima de 50% na concentração de 100 µg/mL),

sendo *L. alba* quimiotipos geraniol e carvona, *L. lacunosa*, *L. rotundifolia* e *L. salviifolia* sobre a linhagem celular MeWo e *L. alba* quimiotipo geraniol, *L. sidoides*, *L. rotundifolia* e *L. salviifolia* sobre a linhagem celular CT26.WT. Células de CT26.WT e MeWo, em experimentos independentes, foram semeadas em placas de 24 poços na densidade de 2×10^4 células/poço em RPMI. Após 24 h de incubação a 37°C com 5% de CO₂ ou após atingirem 50% de confluência as células foram tratadas com RPMI suplementado com 10% de FBS contendo as soluções de óleos essenciais. As amostras de controle negativo continham 0,4% de DMSO. As concentrações de cada óleo testadas foram 10 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml e 150 µg/ml ou 200 µg/ml, de acordo com estudos prévios (HE et al., 1997; CARNESECCHI et al., 2001; DUNCAN et al., 2004; WISEMAN et al., 2007; JOO et al., 2007; MASTELIC et al., 2008; MESA-ARANGO et al., 2009; JOO e JETTEN, 2010; SUN et al., 2010; HUSSAIN et al 2010; KIM et al., 2011;). As células foram expostas por 12 e 24 h ao tratamento com o óleo essencial e controles. A redução de tempo de exposição e o aumento das concentrações dos óleos essenciais com relação ao que foi utilizado no teste de citotoxicidade aconteceram pelo fato de alterações de ciclo celular ser uma etapa inicial em um possível caso de morte celular. No entanto, foi também feita uma análise de ciclo celular em CT26.WT com soluções dos óleos essenciais com as concentrações das IC50 obtidas no teste de citotoxicidade com exposição de 72 h. Prosseguindo o ensaio, tratamento e controle foram, então, retirados e as células foram ressuspensas em 300 µL de solução HFS (0,05% de iodeto de propídeo, 1% de citrato de sódio 0,5% de triton X 100 e 100 mL de água destilada q.s.p.) (Sigma, St. Louis, MO, USA). As células foram incubadas por 2 h a 4°C. O conteúdo de DNA das células coradas foi analisado utilizando-se FACScan (Becton Dickinson, Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA) e o programa CellQuest (BD Bioscience, San Jose, CA, USA). Os histogramas exibindo as distribuições das fases do ciclo celular de células em G0/G1, S, G2/M e sub-G1 (usado como medida de células apoptóticas) foram analisados pelo programa FlowJo versão 7.6.4 (Treestar, Inc., San Carlos, CA). Todos os ensaios foram realizados pelo menos três vezes, e no mínimo 15.000 eventos por amostra foram analisados. Para verificar a existência de diferenças estatísticas entre as amostras empregou-se ANOVA seguido por teste de Bonferroni através do software GraphPad Prism versão 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Diferenças de $p < 0,05$ foram consideradas significativas.

4.7 ENSAIO DE APOPTOSE POR TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*)

Para verificar a fragmentação do DNA como um indicativo de apoptose, foi realizada marcação utilizando-se o kit APO-BrdU TUNEL (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Essas análises foram realizadas em células da linhagem MeWo, cultivadas em garrafas de 60 mL em RPMI suplementado com 10% de FBS, sendo três garrafas para cada tratamento, tratadas por 24 h, com óleo essencial de *L. alba* quimiotipos geraniol (200 µg/mL) e carvona (100 µg/mL) e *L. lacunosa* (100 µg/mL), de acordo com resultados positivos para presença da fração sub-G1 nos experimentos de análise do ciclo celular supracitados. Ainda um segundo ensaio foi realizado, com as mesmas condições do ensaio anterior, porém empregando tratamento de 12 h de exposição à solução de 200 µg/mL do óleo essencial de *L. alba* quimiotipo geraniol em células de MeWo cultivadas em garrafas de 200 mL. Parte das células deste ensaio foram armazenadas e posteriormente utilizadas para o ensaio de análise da expressão de miRNAs. Em todos os experimentos foi utilizado controle negativo em triplicata, contendo meio RPMI, suplementado com 10% de FBS, e 0,4% de DMSO. Após tratamentos, as células foram fixadas com 1% de paraformaldeído em PBS e colocadas no gelo por 15 min. Foram, então, centrifugadas, lavadas com 5 mL de PBS duas vezes e ressuspensas com PBS mais etanol gelado a 70% (v/v). As células fixadas e permeabilizadas foram coradas com tampão enzimático contendo a terminal deoxinucleotidil transferase (TdT) e BrdUTP. As células lavadas foram incubadas por 30 min em solução de anticorpo anti-BrdU marcado com Alexa Fluor 488. Finalmente, as células foram incubadas por 30 min protegidas da luz com a solução de coloração de 0,5 mL de iodeto de propídeo/RNase A. As células foram analisadas utilizando-se FacScan (Becton Dickinson) e os programas CellQuest (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) e FlowJo versão 7.6.4 (Treestar, Inc., San Carlos, CA).

4.8 ANÁLISE DE MicroRNA

Células de CT26.WT e MeWo tratadas e não tratadas (controle negativo) foram semeadas em três diferentes garrafas de 60 mL (CT26.WT) e 200 mL (MeWo) em RPMI suplementado com 10% de FBS. Após 24 h de incubação a 37°C em 5% de CO₂ ou até as células terem atingido 50% de confluência, elas foram tratadas com RPMI, suplementado com 10% de FBS, contendo os óleos essenciais, nas soluções, para CT26.WT, de 100 µg/mL de *L. alba* geraniol, *L. lacunosa*, *L. rotundifolia* e *L. sidoides* e para MeWo a mesma solução descrita anteriormente em ensaio de TUNEL, 200 µg/mL de *L. alba* quimiotipo geraniol. As células de CT26.WT e MeWo foram incubadas por 12 h. Posteriormente, as células de cada garrafa de MeWo foram divididas e submetidas ao ensaio do TUNEL, da análise do ciclo celular e da expressão de microRNA, já as células de CT26.WT foram todas armazenadas para análise da expressão dos microRNAs. Na linhagem MeWo, apenas as células tratadas com *L. alba* geraniol por 12 h foram submetidas ao experimento de microRNA devido ao resultado positivo do ensaio de TUNEL, indicativo de apoptose.

Para as análises de microRNA as células foram submergidas em RNAlater (Ambion Inc., Austin, TX, USA) e armazenadas a 4°C por 24 h e posteriormente transferidas para -80°C. O RNA total foi isolado utilizando-se *mirVana miRNA isolation kit* (Ambion Inc., Austin, TX, USA), de acordo com as orientações do fabricante. O RNA foi quantificado no Espectrofotômetro NanoDrop ND-100 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) e a qualidade da extração foi avaliada pelo kit Agilent Small RNA Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) no aparelho Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). O kit *Cancer MicroRNA qPCR array with Quantimir* (System Biosciences, Mountain View, CA, USA), para perfil de expressão de 95 microRNAs relacionados a apoptose, progressão celular, desenvolvimento e câncer, foi utilizado para examinar a expressão diferencial de miRNAs nos *pools* formados por células de CT26.WT tratadas pelos óleos essenciais e não tratadas (controle negativo) coletadas das três garrafas de 60 mL independentes e para amostras separadas em duplicata de controle negativo e tratamento em MeWo. A transcrição reversa dos microRNAs empregou a tecnologia Quantimir cDNA que converte pequenos RNAs em cDNAs. O

perfil dos microRNAs foi obtido de acordo com as instruções do fabricante. Os primers *forward* utilizados neste estudo foram desenhados para serem a exata sequência dos microRNAs e estão listados na base de dados miRBase (<http://www.mirbase.org>). O *real-time* PCR foi realizado em condições padrão de corrida (40 ciclos, 60°C anelamento/extensão) no ABI Prism 7300 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) de acordo com as direções do fabricante do kit. As amostras foram normalizadas para o transcrito U6 e analisadas com o software REST 384 por teste de realocação randomizada fixa de pares (PFAFFL, HORGANL e DEMPFLER, 2002) e pelo método de $\Delta\Delta C_t$. Os valores de expressão relativa são mostrados como média \pm erro padrão e diferenças com $p < 0,05$ foram consideradas significativas.

5 RESULTADOS

5.1 COMPOSIÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS OBTIDOS DAS CINCO ESPÉCIES DE *Lippia*

Os óleos essenciais das espécies de *Lippia* foram analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM) e a Tabela 1 apresenta os componentes majoritários identificados em cada óleo nas duas análises realizadas, referentes aos dois períodos de extração. Ao todo, 19 compostos principais foram destacados. Os óleos de *Lippia* apresentaram um perfil formado por diversos componentes em pequenas quantidades e alguns poucos destacados com altos percentuais. Tais compostos perfazem aproximadamente 50 a 90% do conteúdo do óleo essencial (Tabela 1).

Lippia alba quimiotipo geraniol exibiu como majoritários os compostos geraniol, citral, limoneno e elemol. Já o quimiotipo carvona exibiu carvona, limoneno e germacreno D. Para *L. sidoides* os compostos mais abundantes foram timol e o-cimeno. *L. salviifolia* na primeira extração apresentou os majoritários nerolidol, germacreno D e (E)-cariofileno, já na segunda extração houve uma diferença entre esses compostos principais, sendo eles β -pineno, sabineno, epi- α -bisabolol, germacreno D e limoneno. Para *L. rotundifolia*, diferenças entre os majoritários também foram observadas entre a primeira e a segunda extração, sendo eles β -mirceno, farnesol (E,Z), farnesol (E,E) e farnesol (Z,Z) na primeira e β -mirceno, β -pineno, α -felandreno e limoneno na segunda. Em *L. lacunosa* os principais compostos foram mircenona e β -mirceno. Diferenças percentuais foram observadas dentre os compostos, com algumas inversões dentre o primeiro e segundo majoritários comparando as duas extrações. Vale destacar que os percentuais são relativos às quantidades dos demais compostos da mesma amostra retidos e selecionados. Portanto em uma extração com poucos compostos demarcados para análise, como na segunda (Tabela 1), os percentuais tornam-se maiores. No entanto, os perfis cromatográficos das substâncias presentes nos óleos de ambas as

extrações são muito semelhantes, alterando a altura de alguns picos devido às diferenças de quantidades dos compostos. Apenas o ensaio antiproliferativo foi realizado com óleos da primeira ou da segunda extração. Todos os demais ensaios – ciclo celular, TUNEL e análise de microRNAs – foram realizados apenas com óleos da segunda extração.

Tabela 1

Componentes majoritários (percentuais acima de 6%) presentes no óleo essencial de *L. alba* quimiotipo geraniol, *L. alba* quimiotipo carvona, *L. sidoides*, *L. salviifolia*, *L. rotundifolia* e *L. lacunosa* em duas extrações (outubro de 2009 a fevereiro de 2010 - 1ª extr. - e de novembro a dezembro de 2010 - 2ª extr.) (IK: Índice de Kovats)

Componente	IK	<i>L. alba</i> (geraniol)		<i>L. alba</i> (carvona)		<i>L. sidoides</i>		<i>L. salviifolia</i>		<i>L. rotundifolia</i>		<i>L. lacunosa</i>	
		1ª extr.	2ª extr.	1ª extr.	2ª extr.	1ª extr.	2ª extr.	1ª extr.	2ª extr.	1ª extr.	2ª extr.	1ª extr.	2ª extr.
Sabineno	976	-	-	-	-	-	-	-	13,12	-	-	-	-
β-Pineno	980	-	-	-	-	-	-	-	17,22	-	16,3	-	-
β-Mirceno	991	-	-	-	-	-	-	-	-	18,48	52,39	19,47	53,52
α-Felandreno	1005	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13,27	-	-
o-Cimeno	1022	-	-	-	-	10,89	30,08	-	-	-	-	-	-
Limoneno	1031	9,62	22,43	21,34	55,98	-	-	-	6,81	-	10,94	-	-
Mircenona	1148	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	58,57	25,41
Citral	1240	26,13	20,54	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Carvona	1242	-	-	48,35	32,26	-	-	-	-	-	-	-	-
Geraniol	1270	36,53	29,24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Timol	1290	-	-	-	-	63,2	38,42	-	-	-	-	-	-
(E)-Cariofileno	1418	-	-	-	-	-	-	7,06	-	-	-	-	-
Germacreno D	1480	-	-	7,91	-	-	-	18,3	8,33	-	-	-	-
Elemol	1549	8,24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nerolidol	1564	-	-	-	-	-	-	49,22	-	-	-	-	-
Epi-α-bisabolol	1686	-	-	-	-	-	-	-	11,13	-	-	-	-
Farnesol (Z,Z)	1713	-	-	-	-	-	-	-	-	10,6	-	-	-
Farnesol (E,E)	1722	-	-	-	-	-	-	-	-	10,91	-	-	-
Farnesol (E,Z)	1742	-	-	-	-	-	-	-	-	16,47	-	-	-
TOTAL		80,52	72,21	77,6	88,24	74,09	68,5	74,58	56,61	56,46	92,9	78,04	78,93
Nº de compostos retidos selecionados		17	7	16	5	13	8	21	16	27	5	15	4

5.2 EFEITO ANTIPROLIFERATIVO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS ESPÉCIES DE *Lippia* CONTRA AS LINHAGENS CELULARES TUMORAIS

Foi realizado ensaio de metabolização do difenil tetrazólio (MTT) com os seis diferentes óleos de *Lippia* sobre as cinco linhagens de células tumorais (MeWo, CT26.WT, A549, MDA MB-23 e CACO-2) e a linhagem de célula normal (CHO-K1) com tratamentos em quatro diferentes concentrações, 0,1 µg/mL, 1 µg/mL, 10 µg/mL e 100 µg/mL. As amostras de controle negativo continham 0,4% de DMSO, que é

equivalente à porcentagem encontrada na maior concentração avaliada. As amostras de controle positivo continham 5-FU em quatro diferentes concentrações, 0,1 μM , 1 μM , 10 μM e 100 μM . Após 72 h a viabilidade celular foi avaliada e puderam ser obtidos IC50 (concentração que corresponde a 50% de letalidade celular) a partir da ação dos óleos de *L. alba*, quimiotipos geraniol e carvona, e *L. lacunosa* sobre a linhagem celular MeWo, de *L. sidoides*, *L. salviifolia* e *L. rotundifolia* sobre a linhagem celular CT26.WT e *L. alba*, quimiotipo carvona, sobre a linhagem A549. (Tabela 2). Excetuando-se a linhagem CACO-2, em todas as demais, o controle positivo empregado alcançou nível de IC50.

Tabela 2

Valores de IC50 obtidos após ensaio antiproliferativo dos óleos de *Lippia* sobre as linhagens de células tumorais e a linhagem normal.

Linhagens		Valores de IC50 ($\mu\text{g/mL}$)						5-FU
		<i>L. alba</i> (geraniol)	<i>L. alba</i> (carvona)	<i>L. sidoides</i>	<i>L. salviifolia</i>	<i>L. rotundifolia</i>	<i>L. lacunosa</i>	
Tumorais	MeWo	54,9	15,8	-	-	-	50,1	8,3*
	CT26	-	-	19,1	30,2	36,3	-	7,9
	A549	-	47,8	-	-	-	-	8,3
	MDA MB-23	-	-	-	-	-	-	7,6
Normal	CHO-K1	-	-	-	-	-	-	79,4

* Valor médio obtido da repetição de três ensaios .

Tabela 3

Valores obtidos para inibição celular acima de 50% na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ após ensaio antiproliferativo dos óleos de *Lippia* sobre as linhagens de células tumorais e a linhagem normal.

Linhagens		Porcentagem de inibição acima de 50% na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$						5-FU
		<i>L. alba</i> (geraniol)	<i>L. alba</i> (carvona)	<i>L. sidoides</i>	<i>L. salviifolia</i>	<i>L. rotundifolia</i>	<i>L. lacunosa</i>	
Tumorais	MeWo	64,4	75,4	-	97,0	81,8	86,1*	83,7*
	CT26	57,6	-	83,7	59,9	59,9	-	84,6
	A549	-	64,5	-	-	-	-	81,1
	MDA MB-23	-	-	-	-	-	-	76,7
Normal	CHO-K1	-	-	-	-	-	-	57,9

* Valor médio obtido da repetição de três ensaios .

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (*National Cancer Institute*) dos Estados Unidos, são considerados citotóxicos extratos vegetais crus com IC50 menores que 30 µg/mL (MESA-ARANGO et al. 2009; HENNEBELLE et al. 2008). Desta forma seriam considerados citotóxicos apenas os óleos de *L. alba* quimiotipo carvona sobre a linhagem MeWo (15,8 µg/mL) e o óleo de *L. sidooides* sobre a linhagem CT26.WT (19,05 µg/mL). O óleo de *L. salviifolia* em CT26.WT (30,2 µg/mL) estaria no limiar deste nível estabelecido. O controle positivo 5-FU foi citotóxico sobre todas as linhagens tumorais, no entanto, por ser uma substância já empregada no tratamento do câncer, exibiu seletividade, não atingindo níveis citotóxicos de IC50 sobre a linhagem celular normal testada, CHO-K1. Os óleos essenciais de *Lippia* também não comprometeram a viabilidade celular da linhagem normal (Tabela 2 e Apêndice A). Esta seletividade é uma importante característica para substâncias antitumorais, uma vez que o não comprometimento das células saudáveis é, atualmente, um dos maiores desafios das terapias anticancerígenas.

O objetivo deste ensaio de citotoxicidade foi realizar uma seleção inicial entre os seis óleos buscando-se quais deles comprometeriam a viabilidade celular e de quais linhagens. Por conta deste objetivo, além do parâmetro IC50, foi utilizado também para a realização deste *screening*, um outro parâmetro, a capacidade dos óleos essenciais testados de promoverem uma inibição do crescimento celular maior que 50% sob efeito da concentração de 100 µg/mL (Tabela 3). A partir desta análise e dos IC50 obtidos foram selecionados, então, para testes subsequentes de progressão do ciclo celular, óleos essenciais de *L. alba*, quimiotipos geraniol e carvona, *L. lacunosa*, *L. rotundifolia* e *L. salviifolia* para a linhagem celular MeWo e *L. alba* quimiotipo geraniol, *L. sidooides*, *L. rotundifolia* e *L. salviifolia* para a linhagem celular CT26.WT.

5.3 EFEITO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS ESPÉCIES DE *Lippia* NA PROGRESSÃO DO CICLO CELULAR DAS LINHAGENS TUMORAIS MEWO E CT26.WT

A Tabela 4 e a Figura 5 apresentam o efeito do óleo essencial de *L. alba* quimiotipo geraniol, *L. alba* quimiotipo carvona, *L. rotundifolia* e *L. lacunosa* sobre a progressão do ciclo celular de células da linhagem MeWo. Já as Tabelas 5 e 6 e a Figura 6 apresentam o efeito estatisticamente significativo do óleo essencial de *L. alba* quimiotipo geraniol, *L. sidoides*, *L. salviifolia* e *L. rotundifolia* sobre a progressão do ciclo celular de células da linhagem CT26.WT, além do teste de 72 h com concentrações do ensaio de MTT e baseadas na literatura.

Tabela 4

Porcentagem populacional de células da linhagem **MeWo** nas fases sub-G1 (DNA sub-diplóide), G0/G1, S e G2/M do ciclo celular submetidas a tratamento com os óleos essenciais de *L. alba* quimiotipo geraniol, *L. alba* quimiotipo carvona, *L. rotundifolia* e *L. lacunosa*, nas concentrações de 10, 50, 100 e 150 ou 200 µg/mL, após 12 e 24 h de exposição. As diferenças estatísticas em relação ao controle não tratado foram determinadas por ANOVA seguido de teste de Bonferroni ($p < 0,05$).

Óleo Essencial (soluções)	Sub-G1		G0/G1		S		G2/M		
	12 h	24 h	12 h	24 h	12 h	24 h	12 h	24 h	
<i>Lippia alba</i> quimiotipo geraniol	Controle negativo	14,55±2,83^a	20,52±5,70^a	42,15±4,40^a	33,27±4,16^a	16,22±3,23^{a/c}	26,88±2,27^a	18,73±3,00^a	14,35±1,43^a
	10 µg/mL	18,87±6,58 ^{a/c}	24,05±2,68 ^a	42,45±6,36 ^a	38,38±1,93 ^{ab}	14,68±0,70 ^{a/d}	22,84±4,39 ^{ab}	16,99±2,01 ^a	11,37±1,50 ^{ad}
	50 µg/mL	27,94±7,58 ^{b/c}	23,34±1,73 ^a	31,32±2,47 ^b	49,52±4,94 ^b	9,86±2,42 ^{b/c/d}	18,5±2,77 ^{ab}	22,00±2,78 ^{ab/b}	6,33±0,63 ^b
	100 µg/mL	27,83±6,52 ^{b/c}	26,61±2,98 ^a	19,76±2,76 ^c	43,15±5,99 ^{ab}	15,13±2,51 ^{a/d}	15,85±4,76 ^b	21,15±3,15 ^{ab/b}	10,21±2,03 ^{bd}
	200 µg/mL	32,18±1,92 ^{b/c}	91,06±0,52 ^b	39,63±1,92 ^{a/b}	1,78±0,35 ^c	8,49±3,01 ^{b/d}	4,14±1,60 ^c	13,65±0,21 ^{a/c}	2,18±0,59 ^c
<i>Lippia alba</i> quimiotipo carvona	Controle negativo	10,67±6,04^a	7,42±0,46^a	42,10±4,25^a	50,87±1,55^a	27,07±2,48^a	24,66±0,60^a	14,04±2,77^a	14,78±1,61^a
	10 µg/mL	8,29±1,22 ^a	9,07±0,68 ^a	40,85±2,87 ^a	45,24±1,01 ^a	29,30±1,05 ^a	26,82±0,93 ^{ab}	15,32±0,96 ^a	16,41±0,53 ^{ab}
	50 µg/mL	9,44±0,87 ^a	11,17±2,75 ^a	42,55±2,24 ^a	51,75±5,04 ^a	26,15±1,58 ^{ab}	22,23±1,41 ^{a/c}	14,90±1,73 ^a	12,88±0,72 ^{a/c}
	100 µg/mL	11,33±5,80 ^a	17,55±2,79 ^b	45,47±7,32 ^a	60,07±2,87 ^b	21,45±2,05 ^b	13,97±1,21 ^d	14,73±1,17 ^a	6,85±1,06 ^d
	150 µg/mL*	24,59±6,65 ^b	19,57±0,93 ^b	40,85±5,12 ^a	63,84±2,33 ^b	12,07±2,09 ^c	8,22±2,00 ^e	15,10±1,88 ^a	7,18±0,81 ^d
<i>Lippia rotundifolia</i>	Controle negativo	5,96±1,56^a	20,52±5,70^a	54,87±2,05^a	33,27±4,16^a	21,98±2,26^a	26,88±2,27^a	12,29±1,84^a	14,35±1,43^a
	10 µg/mL	9,72±5,85 ^a	18,47±0,36 ^a	53,32±3,41 ^a	46,2±7,80 ^{ab}	18,46±3,28 ^{ab}	19,23±6,16 ^{ab}	12,98±1,66 ^{ab/b}	12,70±2,76 ^a
	50 µg/mL	9,75±5,27 ^a	18,5±1,85 ^a	58,69±4,09 ^a	41,21±5,21 ^a	17,89±1,81 ^{a/b}	22,41±4,55 ^{ab}	9,98±1,50 ^a	14,49±2,91 ^{ab}
	100 µg/mL	11,93±5,37 ^a	29,94±4,17 ^a	60,10±2,74 ^a	37,61±1,88 ^a	13,06±1,96 ^b	18,01±4,70 ^{ab}	12,07±1,39 ^a	11,56±3,10 ^a
	200 µg/mL	9,13±1,62 ^a	21,30±0,68 ^a	54,35±2,20 ^a	57,57±3,04 ^b	15,99±0,33 ^{b/c}	11,72±3,10 ^b	16,12±0,90 ^b	7,46±0,59 ^{ac}
<i>Lippia lacunosa</i>	Controle negativo	14,37±1,30^a	30,36±4,77^a	Não calculado	Não calculado	Não calculado	Não calculado	Não calculado	Não calculado
	10 µg/mL	98,45±0,61 ^b	99,81±0,04 [*]						
	50 µg/mL	99,30±0,21 ^b	99,89 ^{**}						
	100 µg/mL	99,26±0,66 ^b	99,94 ^{**}	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
	200 µg/mL	99,28±0,29 ^b	99,92 ^{**}						

* Amostra em duplicata

** Amostra única

As letras diferentes entre os valores indicam diferença estatisticamente significativa.

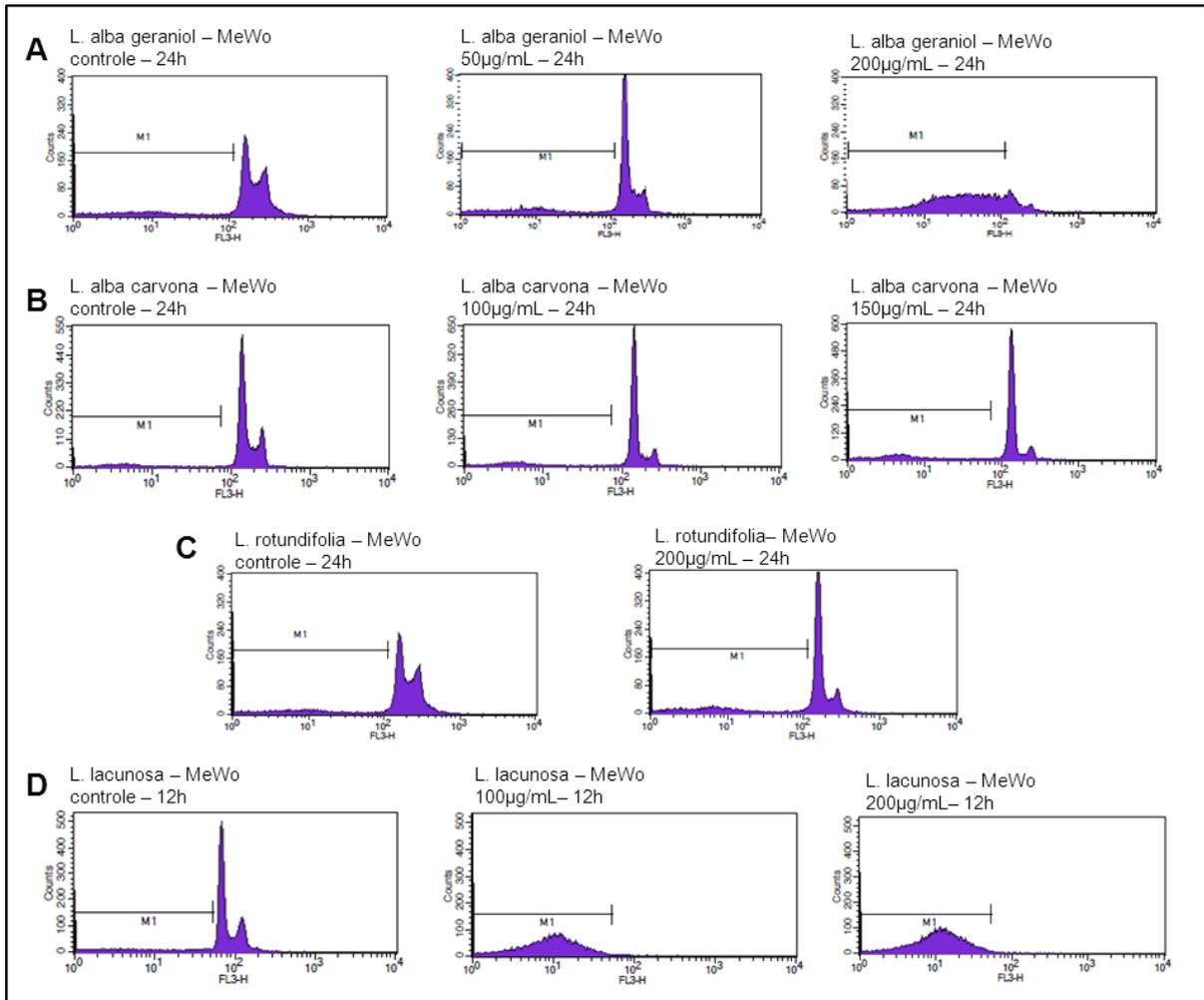


Figura 5. Histogramas representativos da distribuição das fases do ciclo celular em células da linhagem MeWo após tratamento de 12 ou 24 h com óleos essenciais de *Lippia* em diferentes concentrações comparadas ao controle negativo. Apenas alguns dos resultados obtidos com diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) em relação ao controle foram mostrados. O traço M1 corresponde à fração sub-G1. **A.** Óleo de *L. alba geraniol*, após 24 h, na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$, induziu aumento populacional na fase G0/G1 e na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$, elevado percentual de DNA fragmentado, indicando morte celular. **B.** Óleo de *L. alba carvona*, após 24 h, induziu parada do ciclo celular na fase G0/G1 nas concentrações de 100 e 150 $\mu\text{g/mL}$. **C.** Óleo de *L. rotundifolia*, após 24 h, induziu parada de ciclo celular na fase G0/G1 na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$. **D.** Óleo de *L. lacunosa*, após 12 h, induziu alta fragmentação do DNA, indicando morte celular nas concentrações de 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 5

Porcentagem populacional de células da linhagem **CT26.WT** nas fases sub-G1 (DNA sub-diplóide), G0/G1, S e G2/M do ciclo celular submetidas a tratamento com os óleos essenciais de *L. alba* quimiotipo geraniol, *L. sidoides*, *L. salviifolia* e *L. rotundifolia*, nas concentrações de 10, 50, 100 e 150 ou 200 µg/mL, após 12 e 24 h de exposição. As diferenças estatísticas em relação ao controle não tratado foram determinadas por ANOVA seguido de teste de Bonferroni ($p < 0,05$).

Óleo Essencial (soluções)		Sub-G1		G0/G1		S		G2/M	
		12 h	24 h	12 h	24 h	12 h	24 h	12 h	24 h
<i>Lippia alba</i> quimiotipo geraniol	Controle negativo	< 4	< 5	25,65±1,58^a	27,37±1,30^a	40,34±2,82^a	39,38±1,38^a	24,25±4,03^a	23,46±1,56^a
	10 µg/mL			31,12±2,04 ^b	32,35±0,75 ^b	39,91±0,96 ^a	35,29±1,20 ^a	17,96±0,83 ^b	23,11±0,34 ^a
	50 µg/mL			23,69±0,1 ^a	23,07±0,82 ^c	20,53±1,40 ^b	17,31±2,35 ^b	41,89±0,87 ^c	45,31±2,75 ^b
	100 µg/mL			21,03±0,61 ^a	21,26±1,17 ^c	30,98±2,50 ^c	27,33±2,27 ^c	32,40±2,34 ^d	39,03±1,32 ^c
	200 µg/mL			23,46±73 ^a	41,54±1,15 ^d	35,83±2,40 ^a	25,22±4,47 ^c	26,35±0,74 ^a	26,10±4,02 ^a
<i>Lippia sidoides</i>	Controle negativo	< 4	< 2	28,59±3,44^a	29,62±2,00^a	38,35±3,32^a	39,12±2,48^{ab}	18,81±3,93^a	18,32±1,40^a
	10 µg/mL			26,82±3,18 ^a	33,82±1,50 ^{ab}	35,50±3,35 ^a	34,30±1,91 ^a	18,86±1,69 ^a	19,52±1,77 ^a
	50 µg/mL			27,84±1,69 ^a	31,35±2,84 ^a	25,98±2,32 ^b	37,04±0,90 ^{ab}	26,15±1,38 ^{ab}	18,93±1,59 ^a
	100 µg/mL			23,64±1,76 ^a	38,17±1,92 ^b	19,14±2,66 ^c	30,31±1,15 ^{ac}	33,25±5,88 ^b	21,23±1,88 ^a
	150 µg/mL			19,53±1,36 ^b	33,32±2,82 ^a	26,57±1,61 ^b	18,65±4,29 ^b	31,76±1,38 ^b	35,68±4,04 ^b
<i>Lippia salviifolia</i>	Controle negativo	< 1	< 1	32,17±3,57^a	33,03±2,76^a	33,29±4,43^a	31,54±2,38^a	17,77±1,40^a	18,06±3,89^a
	10 µg/mL			37,78±4,0 ^a	33,00±0,79 ^a	32,40±2,35 ^a	31,94±1,31 ^a	14,40±1,51 ^a	16,85±0,95 ^a
	50 µg/mL			35,78±2,26 ^a	32,49±1,69 ^a	35,30±3,82 ^a	30,18±1,46 ^a	17,54±2,42 ^a	18,12±1,43 ^a
	100 µg/mL			37,94±4,22 ^a	30,52±1,50 ^a	33,88±4,92 ^a	27,58±2,11 ^a	15,93±1,31 ^a	21,33±4,19 ^a
	150 µg/mL			39,76±2,59 ^a	27,27±1,31 ^b	28,40±0,8 ^a	30,04±1,21 ^a	16,76±3,22 ^a	25,08±2,56 ^b
<i>Lippia rotundifolia</i>	Controle negativo	< 3	< 1	29,76±1,87^a	36,55±0,47^a	38,75±2,44^a	29,60±1,17^a	15,57±2,36^a	20,46±1,19^a
	10 µg/mL			33,77±2,74 ^{ab}	37,90±1,80 ^a	35,54±2,33 ^a	28,04±1,58 ^{ab}	15,93±2,48 ^a	20,98±2,00 ^a
	50 µg/mL			36,01±1,28 ^b	40,99±1,79 ^{bc}	33,59±1,26 ^b	24,53±0,42 ^b	15,28±3,06 ^a	20,86±1,91 ^a
	100 µg/mL			41,65±2,11 ^c	38,30±0,80 ^a	26,01±1,81 ^c	24,71±0,60 ^{ab}	16,02±1,35 ^a	21,09±1,77 ^a
	200 µg/mL			47,07±3,39 ^c	35,75±1,54 ^a	18,90±1,93 ^d	28,82±4,40 ^a	17,26±1,02 ^a	18,14±2,57 ^a

As letras diferentes entre os valores indicam diferença estatisticamente significativa.

Tabela 6

Porcentagem populacional de células da linhagem **CT26.WT** nas fases sub-G1 (DNA sub-diplóide), G0/G1, S e G2/M do ciclo celular submetidas a tratamento com os óleos essenciais de *L. alba* quimiotipo geraniol, *L. sidoides*, *L. salviifolia*, *L. lacunosa* e *L. rotundifolia*, nas concentrações de 87,00; 19,05; 30,20; 50,00 e 36,30 µg/mL, respectivamente, após 72 h de exposição. As diferenças estatísticas em relação ao controle não tratado foram determinadas por ANOVA seguido de teste de Bonferroni ($p < 0,05$).

Teste de 72 h de exposição	Óleo essencial (soluções)	Sub-G1	G0/G1	S	G2/M
	Controle negativo	4,91±0,75^a	53,25±0,44^a	16,64±1,86^a	18,37±1,15^a
	<i>L. alba</i> (geraniol) - 87,00 µg/mL	15,15±1,50 ^b	31,19±3,78 ^b	16,11±3,20 ^a	31,47±3,22 ^b
	<i>L. sidoides</i> - 19,05 µg/mL	5,98±0,93 ^a	55,42±4,47 ^a	16,38±2,06 ^a	16,99±2,73 ^a
	<i>L. salviifolia</i> - 30,20 µg/mL	5,93±1,60 ^a	54,72±4,26 ^a	17,65±2,18 ^a	17,43±2,08 ^a
	<i>L. lacunosa</i> - 50,00 µg/mL	14,86±2,25 ^b	30,65±1,27 ^b	16,61±0,67 ^a	30,31±0,88 ^b
	<i>L. rotundifolia</i> - 36,30 µg/mL	5,67±1,45 ^a	53,49±3,78 ^a	19,95±2,18 ^a	15,68±1,55 ^a

As letras diferentes entre os valores indicam diferença estatisticamente significativa.

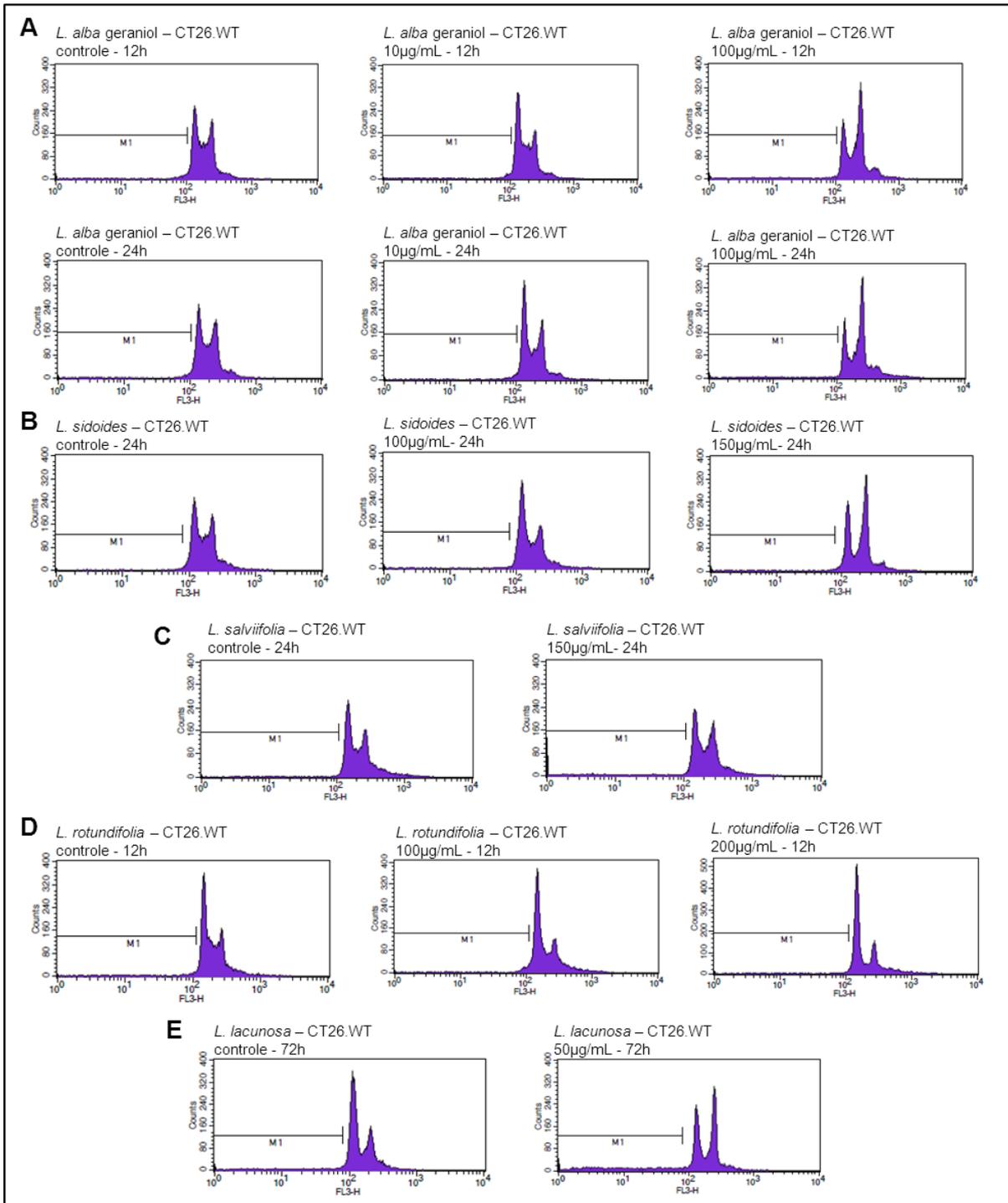


Figura 6. Histogramas representativos da distribuição das fases do ciclo celular em células da linhagem CT26.WT após tratamento de 12, 24 ou 72 h com óleos essenciais de *Lippia* em diferentes concentrações comparadas ao controle negativo. Apenas alguns dos resultados obtidos com diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) em relação ao controle foram mostrados. O traço M1 corresponde à fração sub-G1. **A.** Óleo de *L. alba geraniol*, após 12 h, na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$, induziu aumento populacional na fase G0/G1 e na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, aumento da fase G2/M. Após 24 h, as mesmas alterações foram observadas nas respectivas concentrações. **B.** Óleo de *L. sidoides*, após 24 h, induziu parada do ciclo celular na fase G0/G1 na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ e em G2/M na concentração de 150 $\mu\text{g/mL}$. **C.** Óleo de *L. salviifolia*, após 24 h, induziu aumento populacional na fase G2/M na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$. **D.** Óleo de *L. rotundifolia*, após 12 h, induziu parada de ciclo celular na fase G0/G1 nas concentrações de 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$. **E.** Óleo de *L. lacunosa*, após 72 h, induziu aumento populacional na fase G2/M e alguma fragmentação do DNA.

Nas células da linhagem MeWo, *L. alba* quimiotipo geraniol induziu um aumento significativo de DNA fragmentado (Sub-G1) com as concentrações de 50, 100 e 200 µg/mL após 12 h de exposição. Após 24 h, sob a concentração de 200 µg/mL, esse aumento se tornou expressivo, atingindo em torno de 91% da população celular, o que indica a morte da maioria das células (Tabela 4 e Figura 5). Destaca-se também uma parada do ciclo celular na fase G0/G1 com tratamento de 50 µg/mL após 24 h. O óleo essencial de *L. alba* quimiotipo carvona promoveu parada do ciclo celular na fase G0/G1 nas concentrações de 100 e 150 µg/mL, após 24 h de exposição. Nessas mesmas condições observa-se também um aumento de sub-G1, o que também ocorreu para a concentração de 150 µg/mL após 12 h, diferença percebida pela observação dos valores da Tabela 4. O aumento populacional significativo de células de MeWo na fase G0/G1, foi também observado após 24 h de tratamento com o óleo essencial de *L. rotundifolia* na concentração de 200 µg/mL. Já o óleo essencial de *L. lacunosa* induziu a morte celular em quase 100% da população celular de MeWo em todas as concentrações, tanto após 12 h quanto 24 h de exposição, evidenciada por um aumento expressivo da fase sub-G1, não havendo, portanto, possibilidade de mensuração para as demais fases.

Sobre as células de CT26.WT o óleo essencial de *L. alba* quimiotipo geraniol provocou parada do ciclo celular na fase G0/G1 nas concentrações extremas de 10 e 200 µg/mL após 24 h de exposição e apenas na concentração de 10 µg/mL após 12 h (Tabela 5). Já as concentrações de 50 e 100 µg/mL induziram um aumento populacional significativo das células na fase G2/M após ambos os tempos de exposição submetidos, 12 e 24 h (Tabela 5 e Figura 6). O óleo essencial de *L. sidioides* também comprometeu a população de CT26.WT através da parada do ciclo celular na fase G2/M, que ocorreu nas concentrações de 100 e 150 µg/mL após 12 h, e apenas na concentração de 150 µg/mL após 24 h (Tabela 5 e Figura 6). Pode-se ainda observar que o número de células na fase G0/G1 aumentou após 24 h de exposição ao óleo de *L. sidioides*, na concentração de 100 µg/mL em comparação ao controle (Tabela 5). Com o óleo essencial de *L. salviifolia* houve apenas parada da fase G2/M na concentração de 150 µg/mL após 24 h (Tabela 5 e Figura 6). O óleo essencial de *L. rotundifolia* promoveu parada do ciclo celular na fase G0/G1 sob o efeito das concentrações de 50, 100 e 200 µg/mL após 12 h de exposição e o mesmo efeito apenas sob a concentração 50 µg/mL após 24 h

(Tabela 5 e Figura 6). Nos tratamentos sob exposição de 72 h realizados para a linhagem CT26.WT, apenas os óleos de *L. alba* quimiotipo geraniol (87,00 µg/mL) e *L. lacunosa* (50,00 µg/mL) promoveram efeito estatisticamente significativo de parada do ciclo celular na fase G2/M e um aumento de DNA fragmentado (Tabela 6 e Figura 6).

Observa-se que com a parada do ciclo celular em uma das fases ou com alta fragmentação do DNA, conseqüentemente há uma diminuição populacional de células em outras etapas do ciclo. Desta forma, quando houve apenas uma diminuição estatisticamente significativa dos percentuais de uma fase em relação ao controle, esta diferença não foi citada por ser em decorrência de um provável aumento em outra(s) fase(s), mas não significativo(s).

Diante dos resultados apresentados de fragmentação do DNA sobre a linhagem MeWo, os óleos essenciais de *L. alba* quimiotipos geraniol e carvona e *L. lacunosa*, nas concentrações de 200, 100 e 100 µg/mL respectivamente, com exposição de 24 h foram testados para ensaio de avaliação de apoptose através de TUNEL e posteriormente submetidos à análise de microRNA dependendo dos resultados encontrados. Já sobre a linhagem CT26.WT não houve nenhuma fragmentação de DNA significativa observada, não havendo portanto nas situações testadas, indução de morte celular. Buscando-se um padrão diante desses resultados, foi realizado, então, experimento para a linhagem CT26.WT com o tratamento dos óleos de *L. alba* quimiotipo geraniol, *L. sidoides*, *L. rotundifolia* e *L. lacunosa* diluídos na concentração de 100 µg/mL com exposição de 12 h, pois nessa concentração e tempo uma maior quantidade de efeitos sobre a progressão do ciclo celular foram observados. As células CT26.WT que receberam este tratamento foram armazenadas para posterior ensaio de análise de expressão de microRNAs.

5.4 AVALIAÇÃO DE APOPTOSE POR TUNEL EM LINHAGEM DE MELANOMA MEWO TRATADA COM ÓLEOS DE *Lippia*

Células da linhagem MeWo tratadas com óleo essencial de *L. alba* quimiotipos geraniol (200 µg/mL) e carvona (100 µg/mL) e de *L. lacunosa* (100 µg/mL) por 24 h apresentaram fração sub-G1, indicativa de apoptose, estatisticamente mais elevadas que o controle e, portanto, foram submetidas à avaliação de apoptose por TUNEL através de marcação com o anticorpo anti-BrdU marcado com Alexa Fluor 488. Um controle negativo de células tratadas com DMSO a 0,4%, bem como um controle negativo e um positivo do próprio kit (linhagem celular de linfoma humano) foram também avaliados. A Figura 7 apresenta os resultados obtidos por citometria de fluxo, em que as células tratadas com os óleos essenciais de *L. alba* quimiotipo carvona e *L. lacunosa* exibiram padrão muito semelhante ao controle do experimento e ao controle negativo do kit, não tendo induzido, portanto, a apoptose nas células de MeWo. Neste experimento houve uma baixa contagem de células tratadas com óleo essencial de *L. alba* quimiotipo geraniol o que impossibilitou a sua detecção. Foi realizado, então, outro experimento, em triplicata, com o tratamento deste óleo, na mesma concentração de 200µg/mL, porém com exposição de 12 h sobre células de MeWo. A Figura 7, apresenta então, que sob o tempo de exposição de 12 h o óleo de *L. alba* quimiotipo geraniol induziu a morte celular por apoptose, sendo observada a formação de um grupo disforme como no controle positivo para apoptose do kit. Parte das células desse tratamento foram armazenadas para serem submetidas à análise da expressão de microRNA em experimento seguinte.

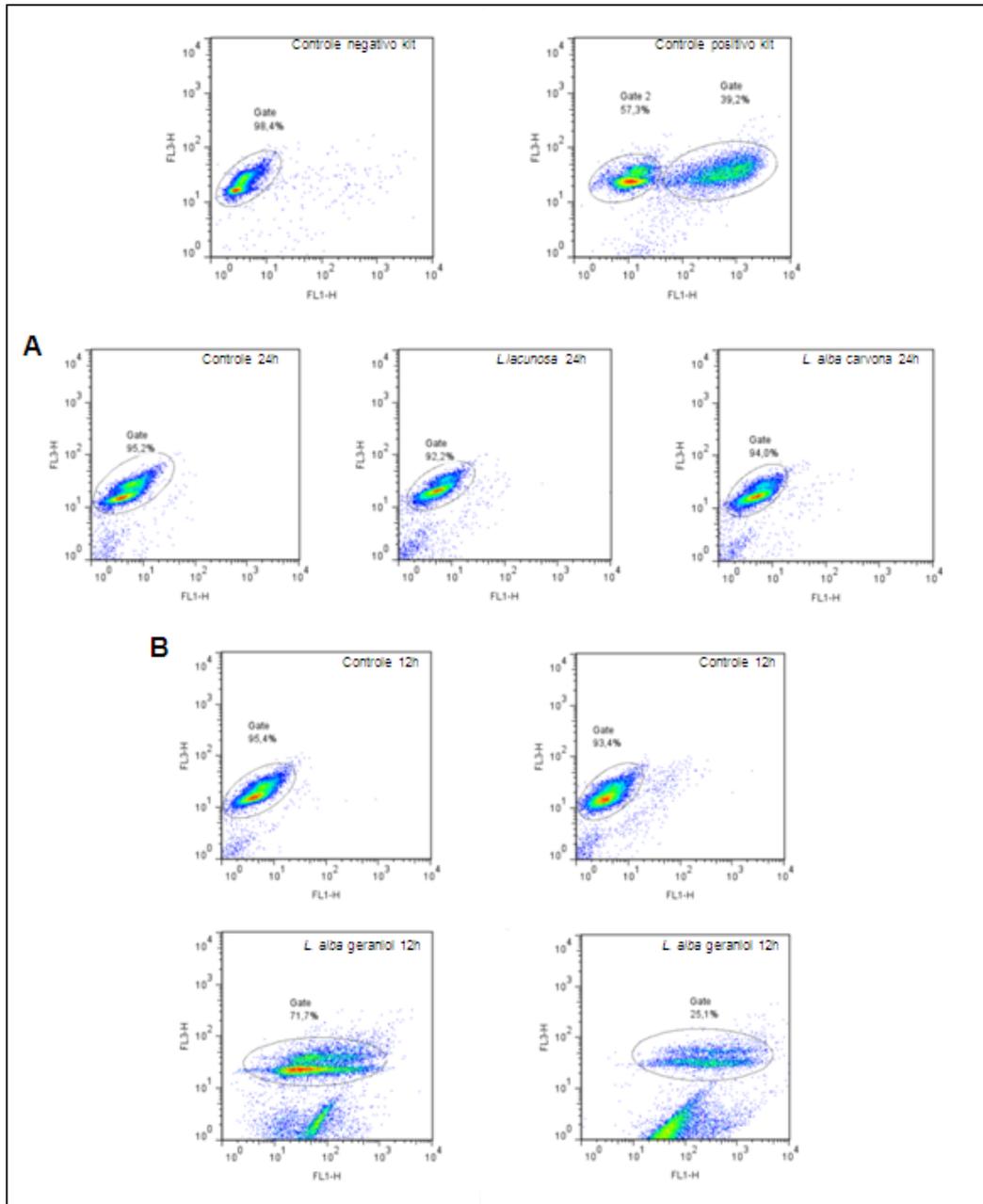


Figura 7. Análise de morte celular por apoptose através de TUNEL após tratamento com óleos de *Lippia* sobre a linhagem MeWo comparados ao controle não tratado e aos controles negativo e positivo do kit. **A.** Células tratadas com os óleos de *L. lacunosa* e *L. alba carvona*, na concentração de 100 µg/mL, por 24 h, exibiram perfil muito semelhante ao controle não tratado, não sendo evidenciada apoptose. **B.** Células tratadas com 200 µg/mL do óleo de *L. alba geraniol*, por 12 h, apresentaram perfil disforme indicativo de apoptose semelhante àquele das células do controle positivo do kit.

5.5 EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE MicroRNAs EM CÉLULAS TUMORAIS TRATADAS COM ÓLEOS DE *Lippia*

Para identificar diferentes padrões de expressão de microRNAs em células da linhagem MeWo tratadas com o óleo essencial de *L. alba* quimiotipo geraniol na concentração de 200 µg/mL por 12 h de exposição e em células da linhagem CT26.WT tratadas com os óleos essenciais de *L. alba* quimiotipo geraniol, *L. sidoides*, *L. salviifolia* e *L. lacunosa*, na concentração de 100 µg/mL por 12 h, foi utilizado ensaio de perfil de expressão de microRNAs baseado em qPCR. Empregou-se painel de 95 microRNAs relacionados ao câncer e o transcrito U6 como sinal de normalização. Análise pelo software REST foi realizada para comparar os padrões de expressão diferencial entre as amostras tratadas e não tratadas.

A partir das quantificações e qualidade das extrações de RNAs obtidas pelo NanoDrop e pelo *Agilent Small RNA Kit* decidiu-se eliminar uma amostra de controle negativo com 0,4% de DMSO e uma de tratamento de *L. alba* geraniol da linhagem MeWo, devido a uma baixa quantificação desta última amostra de tratamento. Desta forma foi realizada análise de microRNAs para dois controles e dois tratamentos por *L. alba* geraniol em MeWo. Os *pools* de controle negativo, *L. alba* geraniol, *L. lacunosa*, *L. rotundifolia* e *L. sidoides* na linhagem CT26.WT foram todos considerados aptos para a análise do perfil de expressão de microRNAs.

Após a realização do *real-time* PCR para cada amostra, foram eliminados os microRNAs que não exibiram amplificação e aqueles em que a curva de *melting* se encontrava com mais de um pico, o que indica falha na especificidade da reação. Desta forma, foi obtido perfil de expressão para 47 microRNAs das células da linhagem MeWo tratadas com *L. alba* geraniol, 59 microRNAs para as células da linhagem CT26.WT tratadas com *L. alba* geraniol, *L. lacunosa* e *L. sidoides* e 57 microRNAs para as células desta mesma linhagem tratadas com *L. rotundifolia* (Tabela 7). Após análise estatística, 41 microRNAs do tratamento da linhagem MeWo foram considerados com expressão alterada de forma estatisticamente significativa em relação ao controle negativo. Já para a linhagem CT26.WT

apresentaram-se com expressão alterada de forma estatisticamente significativa 26 microRNAs para os tratamentos com *L. alba* geraniol e *L. lacunosa* e 35 para os tratamentos com *L. rotundifolia* e *L. sidoides* (Tabela 7).

Todos os microRNAs com a expressão alterada na linhagem MeWo tratada com *L. alba* geraniol se encontram *down*-regulados em relação ao controle negativo (Figura 8). Este resultado foi obtido a partir da média entre a duplicata de controles e entre a de tratamentos. Para a linhagem de carcinoma de cólon CT26.WT tratada com óleo essencial de *L. alba* geraniol, 8 microRNAs encontram-se *up*-regulados e 18 *down*-regulados, já para *L. lacunosa*, que possui o mesmo número total de microRNAs diferencialmente expressos, essa relação passa para 23 e 3. Para os tratamentos com *L. rotundifolia* e *L. sidoides*, foram obtidos 12 e 13 microRNAs *up*-regulados e 23 e 22 *down*-regulados, respectivamente (Tabela 7). A Figura 9 mostra, a partir do *heatmap*, aqueles microRNAs com expressões diferenciais mais altas e mais baixas, em duas diferentes categorias e permite um panorama comparativo entre as semelhanças e diferenças de expressão obtidas para a linhagem CT26.WT. Pode-se destacar como o efeito de *L. lacunosa* foi nitidamente de aumentar a expressão dos microRNAs enquanto o de *L. alba* geraniol foi de diminuir. Para *L. rotundifolia* e *L. sidoides* há um predomínio de diminuição da expressão de microRNAs, mas o painel visual é mais equilibrado, pois muitos têm também sua expressão elevada. Apenas três microRNAs tiveram significativamente a expressão alterada com a ação dos quatro óleos aplicados em CT26.WT: miR-142-3p está *up*-regulado nas quatro amostras, assim como miR-202, porém este último apresenta alta expressão destacada para *L. sidoides*. miR-15b está *up*-regulado para *L. lacunosa* e *down*-regulado para os demais tratamentos. Os óleos de *L. rotundifolia* e *L. sidoides* promoveram aumentos de expressão mais intensos nos microRNAs miR-154, miR-202 e miR-219 (Figuras 9 e 10). Com relação à diminuição da expressão, excetuando-se o tratamento de *L. lacunosa*, os demais óleos atuaram principalmente promovendo este efeito e de maneira equilibrada entre os microRNAs analisados (Figuras 9 e 11). Diversos outros microRNAs apresentaram-se com a expressão alterada pela ação de três, dos quatro óleos essenciais aplicados sobre a linhagem CT26.WT. Dentre estes, os microRNAs miR-143, miR-15a, miR-192, miR-19a+b, miR-218, miR-219 e miR-222 encontram-se *up*-regulados por três tratamentos. Já os microRNAs miR-181c, miR-186, miR-222, miR-

23a e miR-30c foram *down*-regulados por três dos óleos essenciais. Outros microRNAs responderam de forma mista, sendo ou *up*- ou *down*-regulados dependendo do tratamento, mas também desregulados sob ação de três óleos. São eles miR-132, miR-149, miR-181a, miR-185, miR-191, miR-192, miR-21, miR-22 e miR-296 (Figura 9).

Tabela 7

Perfil de expressão dos microRNAs diferencialmente expressos após tratamento com óleos essenciais de *Lippia* nas linhagens celulares MeWo e CT26.

Relação microRNAs	MeWo	CT26.WT			
	<i>L. alba</i> (geraniol)	<i>L. alba</i> (geraniol)	<i>L. lacunosa</i>	<i>L. rotundifolia</i>	<i>L. sidoides</i>
Total	47	59	59	57	59
Significativos ($p < 0,05$)	41	26	26	35	35
Up-regulados	-	8	23	12	13
Down-regulados	41	18	3	23	22

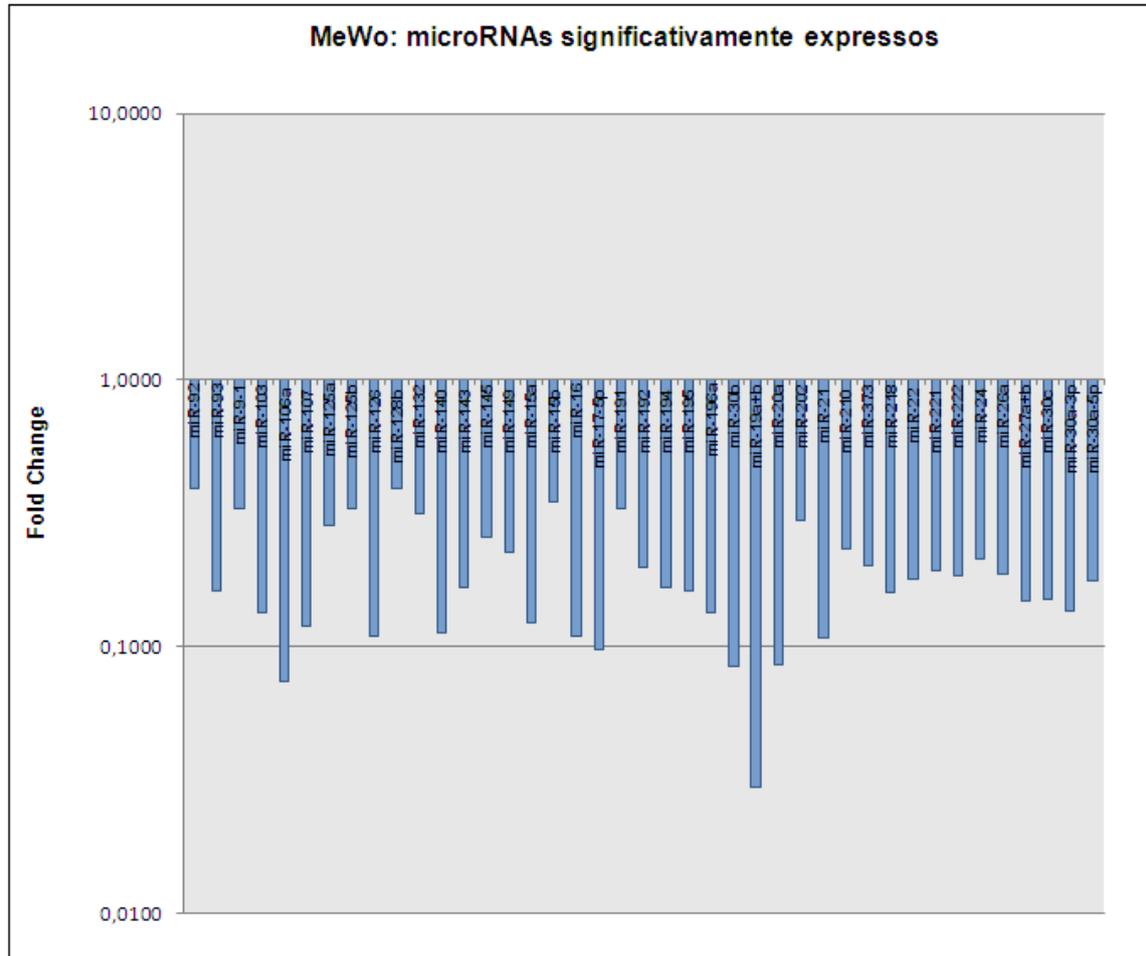


Figura 8. MicroRNAs diferencialmente expressos na linhagem MeWo. Células da linhagem MeWo foram tratadas com 200 µg/mL do óleo de *L. alba* geraniol, por 12 h, e submetidas a análise por *real-time* PCR. Os valores de Ct obtidos para as duplicatas de controle e tratamento foram normalizados a partir do transcrito U6 e analisados pelo software REST (nível de significância com $p < 0,05$). Os valores de *fold change* indicaram 41 microRNAs significativamente *down*-regulados.

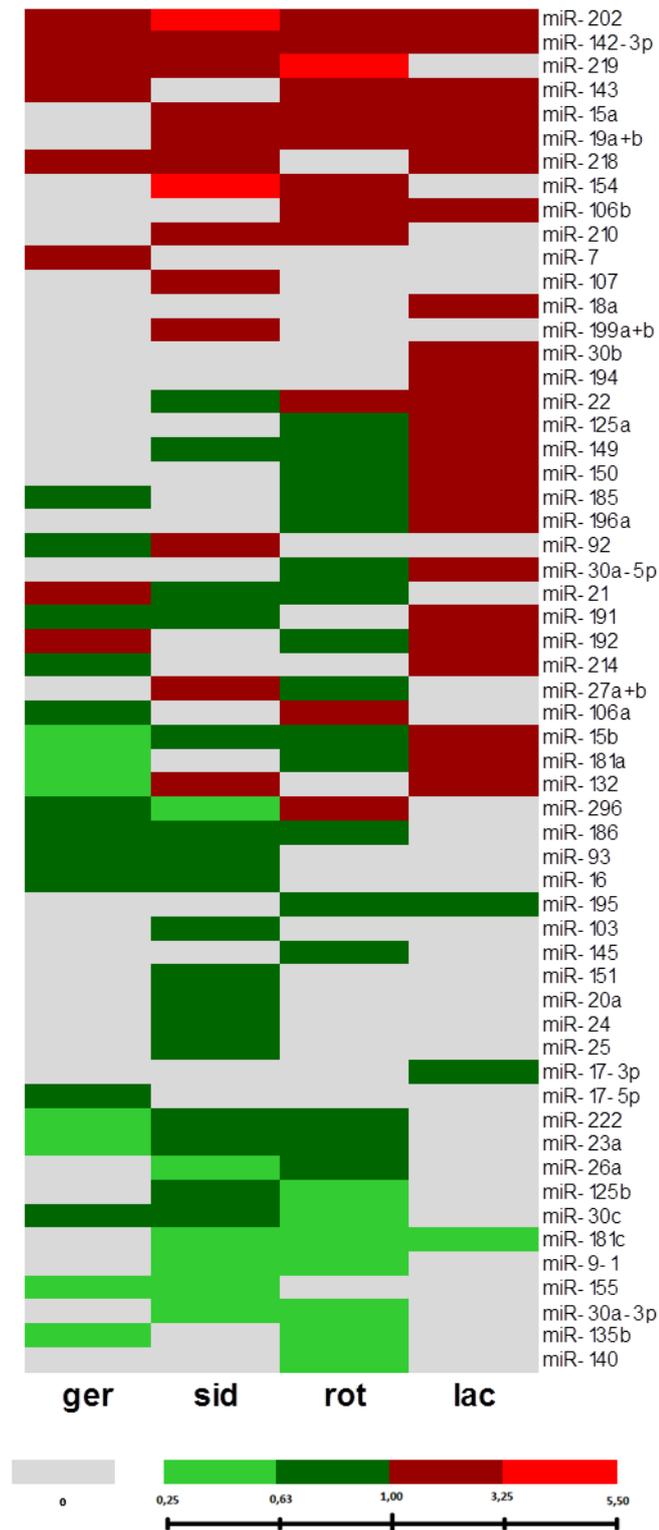


Figura 9. Heatmap dos microRNAs diferencialmente expressos na linhagem CT26.WT após tratamento com óleos de *Lippia*. Células da linhagem CT26.WT foram tratadas com 100 µg/mL do óleo essencial de *L. alba* geraniol (ger), *L. sidoides* (sid), *L. rotundifolia* (rot) e *L. lacunosa* (lac) por 12 h. Um *pool* da triplicata de cada tratamento foi submetido à análise de microRNAs por *real-time* PCR. Os valores de Ct obtidos foram normalizados a partir do transcrito U6 e analisados pelo *software* REST (nível de significância com $p < 0,05$). Os valores de *fold change* obtidos acima de 1, que se referem aos microRNAs *up*-regulados, foram divididos em dois grupos, bem como aqueles entre 0 e 1, que correspondem aos microRNAs *down*-regulados.

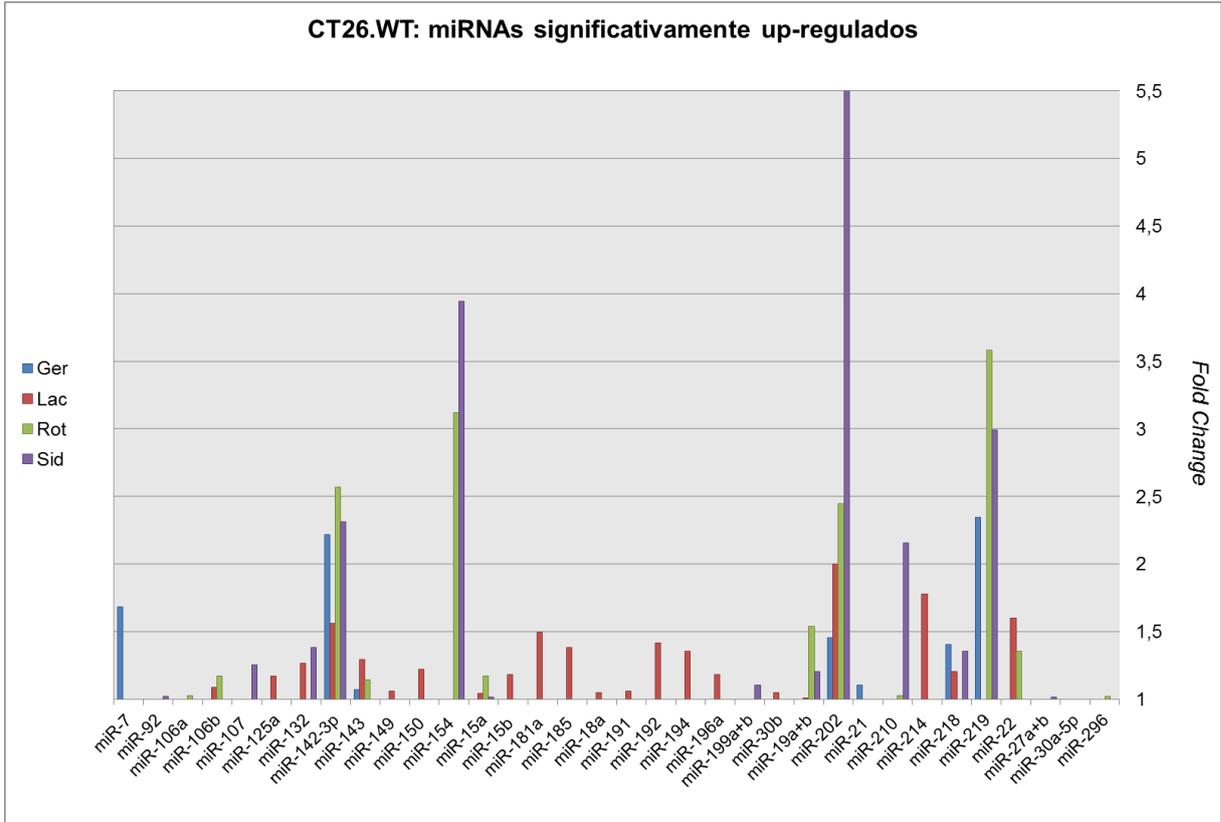


Figura 10. MicroRNAs significativamente *up*-regulados em linhagem CT26.WT após tratamento com óleos essenciais de *Lippia*. *Fold changes* acima de 1 referentes aos microRNAs significativamente *up*-regulados em células de CT26.WT obtidos por *real-time* PCR após tratamento com 100 µg/mL dos óleos essenciais de *L. alba* geraniol (Ger), *L. lacunosa* (Lac), *L. rotundifolia* (Rot) e *L. sidoides* (Sid) por 12 h. O valores de Ct obtidos foram normalizados a partir do transcrito U6 e analisados pelo software REST (nível de significância com $p < 0,05$).

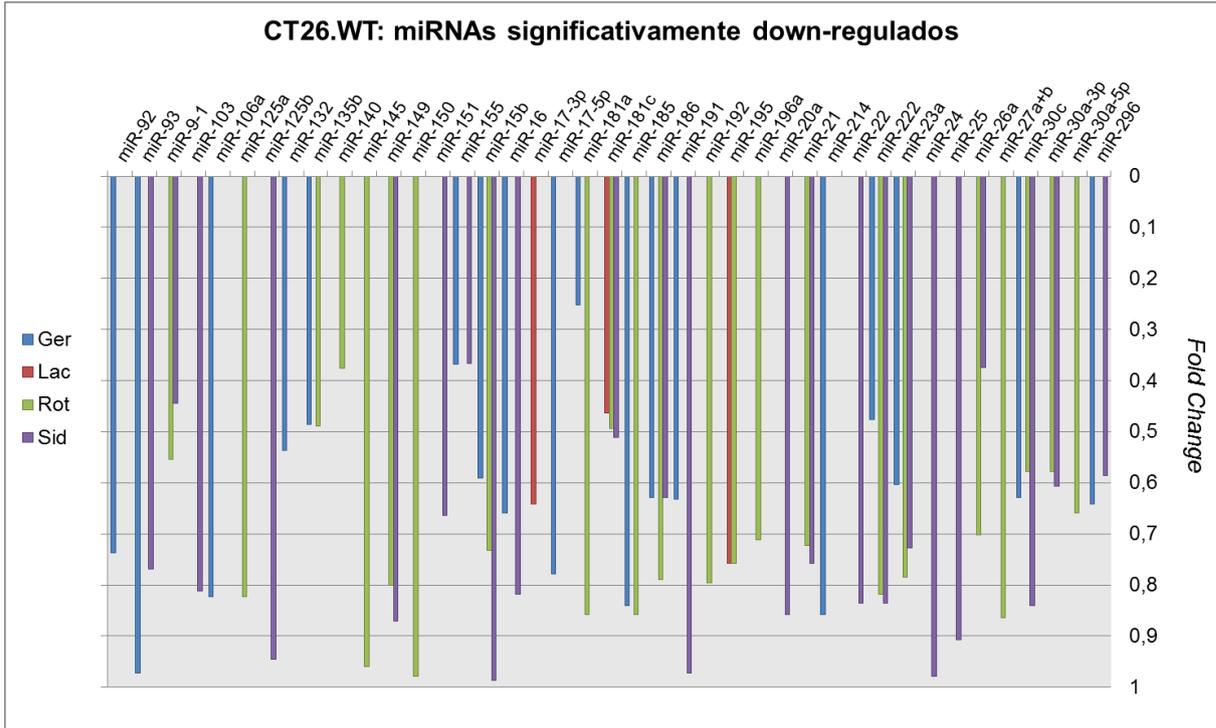


Figura 11. MicroRNAs significativamente *down*-regulados em linhagem CT26.WT após tratamento com óleos essenciais de *Lippia*. *Fold changes* entre 0 e 1 referentes aos microRNAs significativamente *down*-regulados em células de CT26.WT obtidos por *real-time* PCR após tratamento com 100 µg/mL dos óleos essenciais de *L. alba* geraniol (Ger), *L. lacunosa* (Lac), *L. rotundifolia* (Rot) e *L. sidoides* (Sid) por 12 h. O valores de Ct obtidos foram normalizados a partir do transcrito U6 e analisados pelo software REST (nível de significância com $p < 0,05$).

6 DISCUSSÃO

O câncer de pele do tipo melanoma não possui elevada incidência, no entanto, tem alta agressividade e letalidade e o número de novos casos em todo o mundo está aumentando mais rápido que de outros tipos de câncer (INCA, 2011; XU et al., 2012), sendo diagnosticados em torno de 200.000 novos casos anualmente (ERDMANN et al., 2012). O principal tratamento empregado primeiramente para o melanoma cutâneo são terapias cirúrgicas. A remoção cirúrgica precoce do tumor primário confere bom prognóstico, entretanto não há terapias padrões promissoras disponíveis para tratamentos de melanomas em estágios mais avançados (MUELLER e BOSSERHOFF, 2009). Para se evitar o espalhamento de tumores pode-se utilizar terapias adjuvantes, como o uso de interferon- α , no entanto, sua administração deve ser ponderada, pois apresentam significativa toxicidade, reduzindo a qualidade de vida do paciente (GARBE, et al., 2012). Estudos relatam que o melanoma exibe heterogeneidade genética relacionada à localização do tumor e com diferentes associações dessas áreas à exposição solar (CURTIN et al., 2005; VIROS et al., 2008).

Apesar do crescente conhecimento geral de métodos de diagnósticos e significativos progressos no tratamento de câncer colorretal devido aos avanços na cirurgia, radioterapia e quimioterapia, este ainda permanece como um dos tipos mais comuns de câncer em homens e mulheres em todo o mundo (WORTHLEY e LEGGETT, 2010). Inicialmente, esse dado poderia ser uma surpresa estatística, devido ao fato deste tipo de câncer ter uma malignidade bem estudada com fatores de risco definidos e lenta progressão. No entanto, sua alta incidência poderia ser explicada pelo recente reconhecimento de que tumores histologicamente idênticos podem ter prognósticos ou respostas a tratamentos completamente diferentes (DESCHOOLMEESTER et al., 2010, KAHNG, 2010). Como resultado, este tipo de câncer foi definido como uma doença heterogênea multifatorial, levando a uma mudança na área de investigação na direção do desenvolvimento e entendimentos das bases moleculares desta doença, o que inclui susceptibilidade individual, progressão do desenvolvimento, resposta e resistência a tratamentos antitumorais (MARKOWITZ e BERTAGNOLLI, 2009).

Com estes conceitos referentes ao câncer de pele tipo melanoma e ao câncer colorretal em mente, embora vários agentes quimioterapêuticos já tenham sido introduzidos, a necessidade de continuar a busca por novas biomoléculas se torna essencial.

Historicamente, inúmeras drogas têm sido desenvolvidas a partir de compostos isolados de plantas medicinais (LEE, 1999). Desde 1961 tais tipos de compostos vêm sendo aprovados como drogas anticâncer, como vimblastina (Valban), vincristina (Oncovin), etoposídeo (VP-16), teniposídeo (VM-26), paclitaxel (Taxol), vinorelbina (Navelbine), docetaxel (Taxotere), topotecano (Hycamtin) e irinotecano (Camptosar) (DHOLWANlet al., 2008). Recentemente, diferentes estudos sugeriram que monoterpenos e alguns sesquiterpenos podem representar classes de agentes a serem utilizados como drogas anticâncer, o que é especialmente importante para tumores altamente resistentes à quimioterapia e na busca por substâncias que minimizem os efeitos colaterais dos tratamentos atuais (SHOFF et al., 1991, YU et al., 1995, BURKE et al., 1997, HE et al., 1997, CROWELL, 1999, DUNCAN et al., 2004, WISEMAN et al., 2007, CHAOUKI et al., 2009). Alguns desses terpenos são encontrados em espécies de *Lippia*, e o Brasil é um dos maiores centros de diversidade do gênero, compreendendo de 70 a 75% das espécies conhecidas. Desta forma, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos antiproliferativos dos monoterpenos e sesquiterpenos presentes no óleo essencial de cinco espécies de *Lippia* e seus mecanismos de ação. Os compostos majoritários dos óleos essenciais extraídos de cada uma das cinco espécies de *Lippia* estão apresentados na Tabela 1. Para *Lippia alba* quimiotipo geraniol, geranial, citral e limoneno foram os compostos com maiores percentuais obtidos, compreendendo aproximadamente 72% do óleo. Para o quimiotipo carvona, carvona e limoneno foram os principais, formando em torno de 70 a 88% do óleo essencial. Tavares et al. (2005) e Zoghbi et al. (1998) obtiveram esses mesmos componentes dentre os majoritários encontrados, excetuando-se limoneno para *L. alba* quimiotipo geraniol. Para *L. sidoides*, o composto majoritário foi timol (63,2% e 38,42%), estando de acordo com análise feita também por Costa et al. (2005). Para *L. salviifolia*, o composto majoritário do óleo na primeira extração foi nerolidol (49,22%), já na segunda foi β -pineno (17,22%). Singulani et al. (2012) também obtiveram nerolidol como majoritário para *L. salviifolia*, mas β -pineno foi encontrado em baixo

percentual. *L. rotundifolia* apresentou β -mirceno como majoritário e *L. lacunosa*, mircenona e β -mirceno (com inversão do majoritário da primeira para a segunda extração). Leitão et al (2008) obtiveram os mesmos majoritários para *L. lacunosa*, mas não obteve percentual elevado de β -mirceno em *L. rotundifolia*. Com algumas diferenças para *L. salviifolia* e *L. rotundifolia*, de forma geral, os óleos essenciais analisados estão de acordo com a composição qualitativa e em alguns casos também quantitativa de compostos majoritários identificados em estudos prévios.

O efeito antiproliferativo dos óleos essenciais extraídos das espécies de *Lippia* foi investigado utilizando-se ensaio de MTT. As linhagens CT26.WT e MeWo foram as mais afetadas por diferentes óleos essenciais, como indicam os valores de IC50 (Tabela 2) e os valores de inibição celular acima de 50% na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 3) obtidos. Em continuidade à investigação dos efeitos dos óleos essenciais de *Lippia*, células das linhagens MeWo e CT26.WT foram submetidas a ensaio por citometria de fluxo para análise do ciclo celular. As células foram tratadas por 12 e 24 h com os óleos de *Lippia* que mais interferiram sobre o seu crescimento, sendo os óleos essenciais extraídos de *L. alba* quimiotipo geraniol, *L. alba* quimiotipo carvona, *L. rotundifolia* e *L. lacunosa* para a linhagem MeWo e os óleos essenciais de *L. alba* quimiotipo geraniol, *L. sidoides*, *L. salviifolia* e *L. rotundifolia* para CT26.WT, nas concentrações de 10, 50, 100 e 150 ou 200 $\mu\text{g/mL}$. As Tabelas 4, 5 e 7 mostraram os efeitos dos óleos essenciais testados sobre as fases do ciclo celular das linhagens MeWo e CT26.WT. Destacaram-se efeitos de parada de ciclo celular nas fases G0/G1 e G2/M, dependendo das concentrações e tempos de exposição, e de morte celular, que pôde ser observada pelo expressivo aumento de DNA fragmentado (sub-G1) e confirmada como apoptose para *L. alba* geraniol em MeWo pelo ensaio de TUNEL (Figuras 5, 6 e 7).

Esses resultados indicam que o potencial anticancerígeno dos óleos essenciais de *Lippia* testados está relacionado à sua capacidade de interferir na progressão do ciclo celular e de induzir morte celular. De maneira geral, os efeitos produzidos pelos óleos essenciais não foram dose/tempo-dependentes e em alguns casos os efeitos da maior concentração parecem ter sido inibidos já que exibiram valores semelhantes ao da menor concentração, como ocorreu para o óleo de *L. alba* geraniol sobre CT26.WT após 24 h de exposição em que as concentrações de 10 e 200 $\mu\text{g/mL}$ promoveram o mesmo efeito de aumento percentual de células na

fase G0/G1, diferindo do efeito das concentrações intermediárias que ocorreu sobre a fase G2/M.

Geraniol, que é composto majoritário de *L. alba* quimiotipo geraniol (Tabela 1), é a forma oxidada do composto geraniol. Geraniol foi reportado tendo atividades quimiopreventivas *in vitro* e/ou *in vivo* contra alguns tipos de câncer, como leucemia, hepatoma, pancreático, pele, esôfago, próstata, cólon e carcinomas epiteliais mamários (SHOFF et al., 1991, YU et al., 1995, BURKE et al., 1997, CROWELL, 1999, CARNESECCHI et al., 2001, ONG et al., 2006, WISEMAN et al., 2006, KIM et al., 2011). Sousa et al. (2004) obtiveram geraniol como composto majoritário do óleo essencial de *Melissa officinalis* e demonstram atividade antitumoral através de ensaio por MTT sobre linhagens celulares humanas de câncer de pulmão, mama, leucemia e sobre linhagem de melanoma de camundongo. Entretanto existem poucos estudos que objetivam investigar os mecanismos de ação destes compostos. Carneseccchi et al. (2001) e Wiseman et al. (2007) observaram que os efeitos antiproliferativos do geraniol estão relacionados à sua habilidade de interromper o ciclo celular. No entanto, o primeiro reportou que geraniol afeta a progressão através da fase S do ciclo celular em células de câncer de cólon, enquanto o segundo reportou parada em G0/G1 em células de câncer pancreático. Este efeito foi também observado neste último trabalho sob ação de farnesol, um dos compostos majoritários de *L. rotundifolia*, obtido na primeira extração de óleos essenciais realizada neste estudo. Além disso, Wiseman et al. (2007), descreveram papel para p21^{Cip1} e p27^{Kip1} como mediadores da parada de ciclo celular em G0/G1, estando estes com expressão elevada e as ciclinas A, B1 e a CDK2 com níveis reduzidos de expressão, contudo, em estudo prévio com câncer de mama, Duncan et al. (2004) não observaram nenhuma mudança na expressão de inibidores de ciclina quinases com a ação de geraniol. Ainda, Kim et al. (2011) observaram também efeitos desse mesmo composto sobre a redução na expressão das ciclinas A, B, D e E, CDK1, CDK4 e Bcl-2 e um aumento na expressão de p21^{Cip1} e p27^{Kip1}, além de também evidenciar a indução de apoptose em linhagem de câncer de próstata. Já Chaouki et al. (2009) relataram parada no ciclo celular na fase G2/M e apoptose quando células de câncer de mama da linhagem MCF-7 foram tratadas por 48 e 72 h com citral, que é o outro componente encontrado em elevado percentual no óleo essencial de *L. alba* quimiotipo geraniol (Tabela 1). Em concordância com

estes estudos prévios, nossos resultados também indicaram que o efeito antiproliferativo dos óleos essenciais de *L. alba* quimiotipo geraniol estão relacionados à sua habilidade de parar o ciclo celular em mais de uma fase, sendo no nosso estudo em G0/G1 e em G2/M, além de promover fragmentação do DNA, um indício de apoptose, que foi também constatado no presente estudo por meio da ação do óleo sobre a linhagem MeWo. Timol representa o componente majoritário do óleo essencial de *L. siddoides*. He et al. (1997) conseguiram obter IC50 a partir da ação de timol sobre a linhagem de melanoma de camundongo B16F10. Não existem trabalhos relatando a ação de β -pineno, composto majoritário de *L. salviifolia* na segunda extração de óleos essenciais realizada, sobre linhagens ou amostras de câncer, no entanto, Tatman e Mo (2002) relataram ação antiprolifetrativa sobre células de melanoma de camundongo B16F10 e de leucemia humana HL-60 realizada pelo nerolidol, composto majoritário de *L. salviifolia* obtido na 1ª extração. Não foram identificados também trabalhos mostrando efeitos de mircenona, um dos componentes majoritários do óleo essencial de *L. lacunosa* em algum tipo de câncer. Abdallah e Ezzat (2011) mostraram que o óleo essencial extraído de *Pituranthos tortuosos* por simultânea extração hidrodestilação-solvente (n-pentano) que contém β -mirceno como o quarto principal composto (5,53%), mostrou atividade citotóxica contra linhagens celulares de câncer de cólon, além de cânceres de mama e fígado, sendo que este é o composto majoritário de *L. rotundifolia* e *L. lacunosa* na 2ª extração de óleos essenciais.

Como existem poucos estudos investigando mecanismos moleculares de ação dos óleos essenciais extraídos de plantas sobre linhagens de células tumorais e como estudos têm mostrado que alterações na expressão de microRNAs estão presentes em vários tipos de câncer e relacionadas à regulação de genes do ciclo celular, decidiu-se por investigar se as paradas de ciclo celular observadas nas células de MeWo e CT26.WT tratadas com óleos essenciais de *Lippia* estão relacionadas a alterações na expressão de microRNAs. Para este objetivo foi realizado ensaio de perfil de expressão de microRNAs baseado em *real-time* PCR, que contém um painel de 95 microRNAs relacionados a câncer, e análise dos dados pelo *software* REST.

A linhagem MeWo recebeu tratamento de 200 μ g/mL do óleo essencial de *L. alba* geraniol por 12 h e o resultado gerado a partir da média das duplicatas de

controle não tratado e do tratamento apontou que todos os microRNAs estavam *down*-regulados, sendo 41 de maneira estatisticamente significativa. Estudos prévios em linhagens celulares de melanoma e amostras de melanoma de pacientes têm traçado perfis de expressão de microRNAs, principalmente através de *real-time* PCR, microarranjos e sequenciamento, que estão levando à identificação de biomarcadores de formação da doença e transformação maligna, de progressão de estágios primários a avançados e metastáticos e tempo de sobrevivência. Assinaturas de microRNAs diferenciadas vêm sendo observadas entre diferentes linhagens e amostras de lesões. (SEGURA et al., 2010, PHILIPPIDOU et al., 2010, MUELLER et al., 2009, STARK et al., 2010). Satzger et al. (2010), por exemplo, associaram miR-15b à redução da proliferação de células de linhagem tumoral de melanoma e aumento da apoptose. Em outro estudo do mesmo autor, demonstrou-se que o miR-21 *up*-regulado em melanócitos resultou em aumento da proliferação e diminuição da apoptose e, *down*-regulado em linhagem tumoral, promoveu efeito contrário, entretanto, na linhagem MeWo, o aumento da expressão de miR-21 não gerou efeitos funcionais (SATZGER et al., 2012). O tratamento com o óleo de *L. alba* geraniol sobre a linhagem MeWo realizado em nosso estudo, no entanto, gerou um perfil de expressão incomum para os microRNAs avaliados, estando todos *down*-regulados em relação ao controle. Como demonstrado no ensaio de TUNEL realizado essa mesma amostra utilizada para análise da expressão dos microRNAs havia sofrido apoptose. Desta forma, nossa hipótese é de que este perfil com baixa expressão de microRNAs é decorrente da cadeia de transformações celulares do processo apoptótico. Com a morte celular programada desencadeada pela clivagem da caspase-3, tem-se a fragmentação do DNA, degradação de proteínas nucleares e do citoesqueleto, reticulação de proteínas, formação de corpos apoptóticos, expressão de ligantes para os receptores das células fagocíticas e por fim a captação por essas células (ELMORE, 2007). Este contexto, então, poderia ser compatível com uma diminuição generalizada dos níveis de expressão dos microRNAs.

A linhagem CT26.WT recebeu tratamento por 12 h de exposição com os óleos essenciais de *L. alba* geraniol, *L. lacunosa*, *L. rotundifolia* e *L. sidoides* na concentração de 100µg/mL. Os resultados demonstraram que miR-142-3p, miR-15b, e miR-202 se encontravam desregulados nos quatro tratamentos, estando o

miR142-3p e miR-202 *up*-regulado em todos eles e miR-15b apenas *up*-regulado sob ação do óleo de *L. lacunosa*. Monzo et al. (2008), Chen et al. (2009) e Xi et al. (2006) reportaram que o miR-142-3p e o miR-15b estavam também *up*-regulados em câncer colorretal. Ng et al. (2009) identificaram miR-202 *up*-regulado em plasma de pacientes com câncer colorretal. De acordo com esses dados, o óleo essencial de *L. alba* quimiotipo geraniol, *L. rotundifolia* e *L. sidoides* promoveram ação de reverter a expressão de miR-15b na linhagem de câncer colorretal CT26.WT. O microRNA miR-143 se mostrou *up*-regulado em três (exceto *L. sidoides*) dentre os quatro óleos essenciais aplicados contra a linhagem de carcinoma CT26.WT, sendo que este microRNA tem se mostrado consistentemente *down*-regulado em câncer de cólon na literatura (CHEN et al., 2009 e KULDA et al. 2010). Chen et al. (2009) mostraram que o miR-143 age como supressor de tumor através da inibição da tradução do oncogene KRAS. Os óleos essenciais de *L. alba* geraniol, *L. lacunosa* e *L. rotundifolia*, que agiram, então, aumentando a expressão desse microRNA podem levar a uma recuperação de seu mecanismo supressor de tumor. O miR-192 também foi desregulado por três óleos essenciais, *L. alba* quimiotipo geraniol, *L. lacunosa* e *L. rotundifolia*, estando *up*-regulado sob ação dos dois primeiros e *down*-regulado sob ação do segundo. Chen et al. (2009) e Earle et al. (2010) demonstraram que miR-192 estava *down*-regulado em câncer colorretal. Esses resultados indicam que o óleo essencial de *L. alba* quimiotipo geraniol e *L. lacunosa* são capazes de reverter a expressão de miR-192 neste tipo de câncer. Braun et al. (2008) demonstraram ainda que miR-192 é capaz de suprimir a cancerogênese através de acúmulo de p21 e provocar parada de ciclo celular em fase G1 e em fase G2/M em linhagem de câncer colorretal humano HCT116. Visone et al. (2007) relataram que a expressão dos miR-221 e miR-222 é inversamente proporcional ao do inibidor p27^{Kip1}. Com uma expressão forçada de ambos os microRNAs foi reduzido o nível de expressão da proteína p27^{Kip1} em linhagem humana de carcinoma da tireoide induzindo, assim, progressão do ciclo celular para a fase S. miR-222 teve sua expressão diminuída nas células de CT26.WT após ação dos óleos de *L. alba* geraniol, *L. rotundifolia* e *L. sidoides*, dessa forma podem ter contribuído para uma interrupção da progressão do ciclo celular através do aumento da expressão de p27^{Kip1}.

Outros microRNAs tiveram também sua expressão modificada com os tratamentos de óleos essenciais de *Lippia* de modo a reverter sua expressão previamente relatada na literatura em células de câncer de cólon. Os microRNAs miR-196a, miR-214, miR-149 e miR-30b foram mostrados *down*-regulados por Earle et al.(2010), Chen et al. (2009), Monzo et al. (2008), Huang et al. (2010) e Schepeler et al. (2008), respectivamente e nossos resultados demonstraram que esses microRNAs estavam *up*-regulados após células CT26.WT serem tratadas com o óleo essencial de *L. lacunosa*, que promoveu o efeito de aumentar a expressão para a maioria dos microRNAs em que interferiu. Em contrapartida, miR-92, miR-93, miR-135b, miR-155, miR-191, miR-181a e miR-186 foram previamente encontrados *up*-regulados (EARLE et al., 2010, ARNDT et al., 2009, HUANG et al., 2010, SCHEPELER et al., 2008, LI et al., 2010, SARVER et al., 2009, VOLINIA et al., 2006, MONZO et al., 2008, XI et al., 2006), e nosso estudo mostrou que eles foram *down*-regulados em células CT26.WT tratadas com os óleos essenciais de *L. alba* quimiotipo geraniol, *L. rotundifolia* ou *L. sidoides*. Tais reversões de ação observadas podem, portanto, ser o mecanismo de ação através do qual os componentes dos óleos de *Lippia* testados exercem efeito antiproliferativo sobre a linhagem CT26.WT.

Os microRNAs miR-17-3p e miR-17-5p foram *down*-regulados pela ação dos óleos de *L. lacunosa* e *L. alba* geraniol, respectivamente. miR-17-5p tem sido relatado *up*-regulado em tecido de câncer colorretal em estudos prévios (BANDRES et al., 2006 and VOLINIA et al., 2006) e este é membro do *cluster* miR-17-92. Monzo et al. (2008) reportaram que este microRNA é membro crítico do cluster envolvido na regulação da expressão de E2F1, um regulador *upstream* de TP53, em células de câncer colorretal. Esses autores também demonstraram que quando células foram transfectadas com anti-miR-17-5p, a expressão de E2F1 aumentou, reduzindo o crescimento celular de maneira dose dependente. Em outro experimento de transfecção, Kanaan et al.(2012) transfectaram miR-17 na linhagem de câncer de cólon HCT-116 e seus resultados também demonstraram que E2F1 foi *down*-regulado. Desta forma, os efeitos antiproliferativos observados no presente estudo quando células CT26.WT foram tratadas com óleos essenciais de *L. alba* quimiotipo geraniol ou *L. lacunosa* podem ser devido ao aumento da expressão de E2F1 através da baixa expressão observada do seu regulador, miR-17-5p. Além disso,

Cloonan et al. (2008) revelaram que o miR-17-5p atua especificamente sobre a transição das fases G1/S do ciclo celular, interferindo em mais de 20 genes envolvidos nesta transição. Células da linhagem HEK293T (células de rim embrionário humano) exibiam baixo nível de expressão endógena de miR-17-5p. Aquelas transfectadas com esse microRNA passaram a proliferar rapidamente e foi mostrado que essas células com super expressão de miR-17-5p apresentaram significativamente menos células na fase G0/G1 que aquelas do controle não tratado. Então miR-17-5p estimula a proliferação celular agindo na transição de fases G1/S. A sua *down*-regulação provocada pelo óleo de *L. alba* geraniol pode então ter sido um dos mecanismos que levaram à parada de ciclo celular na fase G0/G1 das células de CT26.WT.

Paradas de ciclo celular, apoptose e contra-regulação de microRNAs em células tumorais são importantes características para um potencial composto anticancerígeno. Os resultados obtidos nesse estudo ampliam os conhecimentos medicinais a respeito de plantas do gênero *Lippia* e as colocam em um importante grupo de potenciais agentes para a terapia antitumoral. Os óleos essenciais testados configuram um produto que apresenta certa instabilidade e alta diversidade de constituintes. Uma continuidade ao estudo de suas propriedades farmacológicas poderia incluir o isolamento destes compostos buscando-se as substâncias de ação. Mas, independente do composto em si que poderia ser pesquisado, os resultados gerados conferem ainda possibilidades para terapias in vivo baseadas em mecanismos biotecnológicos.

7 CONCLUSÃO

Esse trabalho mostra pela primeira vez que óleos essenciais das espécies *L. alba*, quimiotipos geraniol e carvona, *L. sidoides*, *L. salviifolia*, *L. rotundifolia* e *L. lacunosa*, exerceram efeito antiproliferativo sobre as linhagens de melanoma MeWo e de carcinoma de cólon CT26.WT, mas não afetaram a linhagem normal testada, destacando uma importante seletividade de ação.

Além disso, os óleos de *L. alba* quimiotipos geraniol e carvona e de *L. rotundifolia* foram capazes de promover parada do ciclo celular na fase G1 nas células de Mewo. Os óleos de *L. alba* geraniol e *L. lacunosa* foram capazes, ainda, de provocar intensa morte celular nas células dessa linhagem, sendo a morte provocada por *L. alba* geraniol confirmada como apoptose. Já sobre a linhagem CT26.WT, os óleos de *L. alba* geraniol, *L. sidoides*, *L. salviifolia*, *L. rotundifolia* e *L. lacunosa* induziram paradas de ciclo celular em fase G0/G1 e/ou em fase G2/M. Não foi observado efeito de morte celular expressivo sobre esta linhagem quando tratada com os óleos essenciais de *Lippia*.

Quase 60 microRNAs de células de CT26.WT foram encontrados desregulados com a ação dos óleos de *L. alba* geraniol, *L. lacunosa*, *L. sidoides* e *L. rotundifolia*. Muitos desses já foram reportados *up*- ou *down*-regulados em células ou amostras de carcinoma de cólon e no nosso estudo apresentaram regulação oposta, apontando a interferência dos óleos essenciais sobre a expressão desses microRNAs.

O presente estudo acredita ter contribuído com importantes entendimentos iniciais a respeito da atividade dos óleos essenciais de espécies de *Lippia* sobre linhagens de células tumorais e ter levantado significativas possibilidades de mecanismos de ação relacionados ao ciclo celular e à expressão de microRNAs. Essas informações enriquecem os estudos da linha de pesquisa com plantas do gênero *Lippia* do Laboratório de Genética da UFJF que já há mais de 10 anos desenvolve pesquisas nessa área e deixa lançada a toda comunidade acadêmica contribuições importantes na busca de novos compostos anticancerígenos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLAH, H. M.; EZZAT, S. M. 2011. Effect of the method of preparation on the composition and cytotoxic activity of the essential oil of *Pituranthos tortuosus*. **Z Naturforsch C.**, **66 (3-4)**:143-8.

ADAMS, R.P. 1995. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois, USA.

AGOSTINI, M.; PUCCIARELLI, S.; CALORE, F.; BEDIN, C.; ENZO, M.V.; NITTI, D. 2010. miRNAs in colon and rectal cancer: A consensus for their true clinical value. **Clinica Chimica Acta**, **411 (17-18)**: 1181-1186.

AKAO, Y.; NAKAGAWA, Y.; NAOE, T. 2006. *let-7* MicroRNA Functions as a Potential Growth Suppressor in Human Colon Cancer Cells. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, **29 (5)**: 903-906.

ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C.R.; SINCERO, T.C.M.; DA SILVA, A.C.; SAVI, L.A.; GAIDO, C.M.; BETTEGA, J.M.R.; MANCINI, M.; DE ALEMEIDA, M.T.R.; BARBOSA, R.A.; FARIAS, M.R.; BARARDI, C.R.M.; SIMÕES, C.M.O. 2005. Antiviral evaluation of plants from brazilian atlantic tropical forest. **Fitoterapia**, **76 (3-4)**: 374-378.

ANTOSIEWICZ, J.; ZIOLKOWSKI, W.; KAR, S.; POWOLNY, A.A.; SINGH, S.V. 2008. Role of oxygen intermediates in cellular responses to dietary cancer chemopreventive agents. **Planta Médica**, **74 (13)**:1570-1579.

ARNDT, G.M.; DOSSEY, L.; CULLEN, L.M.; LAI, A.; DRUKER, R.; EISBACHER, M.; ZHANG, C.; TRAN, N.; FAN, H.; HETZLAFF, K.; BITTNER, A.; RAPONI, M. 2009. Characterization of global microRNA expression reveals oncogenic potential of miR-145 in metastatic colorectal cancer. **BMC Cancer**, **9(374)**: 1-17.

BANDRÉS, E.; CUBEDO, E.; AGIRRE, X.; MALUMBRES, R.; ZÁRATE, R.; RAMIREZ, N.; ABAJO, A.; NAVARRO, A.; MORENO, I.; MONZÓ, M.; GARCÍA-FONCILLAS, J. 2006. Identification by Real-time PCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues. **Molecular Cancer**, **5(29)**: 1-10.

BASÍLIO, D.V.; MATTOS, I.E. 2008. Câncer em mulheres idosas das regiões Sul e Sudeste do Brasil: Evolução da mortalidade no período 1980 – 2005. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, **11 (2)**: 204-14.

BOHLMANN, J.; MEYER-GAUEN, G.; CROTEAU, R. 1998. Plant terpenoid synthases: Molecular biology and phylogenetic analysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **95 (8)**: 4126-4133.

BOTELHO, M.A.; NOGUEIRA, N.A.P.; BASTOS, G.M.; FONSECA, S.G.C.; LEMOS, T.L.G.; MATOS, F.J.A.; MONTENEGRO, D.; HEUKELBACH, J.; RAO, V.S.; BRITO, G.A.C. 2007. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, **40 (3)**: 349-356.

BRAUN, C. J.; ZHANG, X.; SAVELYEVA, I.; WOLFF, S.; MOLL, U. M.; SCHEPELER, T.; ORNTOFT, T. F.; ANDERSEN, C. L.; DOBBELSTEIN, M. 2008. p53-Responsive micrnas 192 and 215 are capable of inducing cell cycle arrest. **Cancer Research**, **68 (24)**: 10094-10104.

BRITO, A. R. M. S.; BRITO, A. A. S. 1993. Forty years of Brazilian medicinal plant research. **Journal of Ethnopharmacology**, **39(1)**: 53-67.

BRITO, M.B.; BARIN, G.B; ARAÚJO, A.A.S.; DE SOUSA, D.P.; CAVALCANTI, S.C.H.; LIRA, A.A.M.; NUNES, R.S. 2009. The action modes of *Lippia sidoides* (Cham) essential oil as penetration enhancers on snake skin. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, **97 (1)**: 323-327.

BURKE, Y.D.; STARK, M.J.; ROACH, S.L.; SEN, S.E.; CROWELL, P.L. 1997. Inhibition of pancreatic cancer growth by dietary isoprenoids farnesol and geraniol. **Lipids**, **32 (2)**: 151-156.

CACERES, A.; GIRON, L. 1987. **Actividad antimicrobiana de plantas usadas en el tratamiento de afecciones de la piel y mucosa**. In: Resúmenes III Seminario Nacional Medicina Tradicional y I Seminario Mesoamericano de Etnofarmacología: 104-109.

CALDAS, C.; HAHN, S. A.; COSTA, L. T.; REDSTON, M. S.; SCHUTTE, M.; SEYMOUR, A. B.; WEINSTEIN, C. L.; HRUBAN, R. H.; YEO, C. J.; KERN, S. E. 1994. Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (*MTS1*) gene in pancreatic adenocarcinoma. **Nature Genetics**, **8**: 27 – 32.

- CARNESECCHI, S.; LANGLE, Y. K.; EXINGER, F.; GOSSE, F.; RAUL, F. 2002. Geraniol, a componente of plant essential oils, sensitizes human colonic cancer cells to 5-fluorouracil treatment. **TheJournal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**.**301(2)**: 625-630.
- CARNESECCHI, S.; SCHNEIDER, Y.; CERALINE, J.; DURANTON, B.; GOSSE, F.; SEILER, N.; RAUL, F. 2001. Geraniol, a component of plant essential oils, inhibits growth and polyamine biosynthesis in human colon cancer cells. **TheJournal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, **298 (1)**: 197-200.
- CARVALHO, A.F.U.; MELO, V.M.M.; CRAVEIRO, A.A.; MACHADO, M.I.L.; BANTIM, M.B.; RABELO, E.F. 2003. Larvicidal activity of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. against *Aedes aegypti* Linn. **Memórias do Instituto Oswald Cruz**, **98 (4)**: 569-571.
- CARVALHO, J.A.M.; GARCIA, R.A. 2003. O envelhecimento da população brasileira: um enfoque demográfico. **Cadernos de Saúde Pública**, **19(3)**: 725-733.
- CASALE, F.; CANAPARO, R.; SERPE, L.; MUNTONI, E.; PEPA, C. D.; COSTA, M.; MAIRONE, L.; ZARA, G. P.; FORNARI, G.; EANDI, M. 2004. Plasma concentrations of 5-fluorouracil and its metabolites in colon cancer patients. **Pharmacological Research**, **50 (2)**: 173-179.
- CERVEIRA, N.; BIZARRO, S.; TEIXEIRA, M.R. 2012. Cancer cell cycle. **CanalBQ**, **9**: 40-47.
- CERVI, A.; HERMSDORFF, H.H.M.; RIBEIRO, R.C.L. 2005. Tendência da mortalidade por doenças neoplásicas em 10 capitais brasileiras, de 1980 a 2000. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, **8 (4)**: 407-418.
- CHAGAS, C.E.A.; VIEIRA, A.; ONG, T.P.; MORENO, F.S. 2009. Farnesol inhibits cell proliferation and induces apoptosis after partial hepatectomy in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, **24 (5)**: 377-382
- CHAOUKI, W.; LEGER, D.Y.; LIAGRE, B.; BENEYTOUT, J.L.; HMAMOUCHE, M. 2009. Citral inhibits cell proliferation and induces apoptosis and cell cycle arrest in MCF-7 cells. **Fundamental & clinical pharmacology**, **23 (5)**: 549-556.
- CHEN, X.; GUO, X.; ZHANG, Y.; CHEN, J.; YIN, Y.; CAI, X.; WANG, K.; BA, Y.; ZHU, L.; WANG, J.; YANG, R.; ZHANG, Y.; REN, Z.; ZEN, K.; ZHANG, J.; ZHANG,

C-Y. 2009. Role of miR-143 targeting KRAS in colorectal tumorigenesis. **Oncogene**, **28 (10)**: 1385–1392.

CHOI, M.A.; KIM, S.H.; CHUNG, W.Y.; HWANG, J.K.; PARK, K.K. 2004. Xanthorrhizol, a natural sesquiterpenoid from *Curcuma xanthorrhiza*, has an anti-metastatic potential in experimental mouse lung metastasis model. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, **326(1)**:210-217.

CIMMINO, A.; CALIN, G.A.; FABBRI, M.; IORIO, M.V.; FERRACIN, M.; SHIMIZU, M.; WOJCIK, S.E.; AQEILAN, R.I.; ZUPO, S.; DONO, M.; RASSENTI, L.; ALEDR, H.; VOLINIA, S.; LIU, C.; KIPPS, T.J.; NEGRINI, M.; CROCE, C.M. 2005. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **27 (39)**: 13944-13949.

CLOONAN, N.; BROWN, M. K.; STEPTOE, A. L.; WANI, S.; CHAN, W. L.; FORREST, A. R. R.; KOLLE, G.; GABRIELLI, B.; GRIMMOND, S. M. 2008. The miR-17-5p microRNA is a key regulator of the G1/S phase cell cycle transition. **Genome Biology**, **9(8)**: R127 1-14.

COLBY, S.M.; ALONSO, W.R.; KATAHIRA, E.J.; MCGARVEY, D.J.; CROTEAU, R. 1993. 4S-limonene synthase from oil glands of spearmint (*Mentha spicata*): cDNA isolation, characterization and bacterial expression of the catalytically active monoterpene cyclase. **The Journal of Biological Chemistry**, **268 (31)**: 23016-23024.

COSTA, J.G.M.; RODRIGUES, F.F.G.; ANGÉLICO, E.C.; SILVA, M.R.; MOTA, M.L.; SANTOS, N.K.A.; CARDOSO, A.L.H.; LEMOS, T.L.G. 2005. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiussi*, *Lippia sidoides* e *Syzygium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, **15 (4)**: 304-309.

COSTA, S.M.O.; LEMOS, T.L.G.; MONTE, F.J.Q.; MATOS, F.J.A. 1998. **Quinona dimérica (tectol) de *Lippia sidoides* (Verbenaceae)**. In: XV Simpósio de Plantas Mediciniais, Resumos, Água de Lindóia.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T.; LEWIS, N. 2000. Natural products (secondary metabolites). Em: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (eds). **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. 1ª edição. American Society of Plant Physiologist. Maryland. pp 1250-1318.

CROWELL, P.L. 1999. Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. **The Journal of Nutrition**, **129 (3)**: 775S-778S (Supplement).

CURIN, J.A.; FRIDLAND, J.; KAGESHITA, T.; PATEL, H.M.; BUSAM, K.J.; KUTZNER, H.; CHO, K.H. Kwang-Hyun; AIBA, S.; BRÖCKER, E.; LEBOIT, M.D.; PINKEL, D.; KUTZNER, H. 2005. Distinct Sets of Genetic Alterations in Melanoma. **The new England journal of medicine**, **353 (20)**: 2135-2147.

DESCHOOLMEESTER M.; BAAY, P.; SPECENIER, F.; LARDON, F.; VERMORKEN, L.B. 2010. A review of the most promising biomarkers in colorectal cancer: one step closer to targeted therapy. **Oncologist**, **15 (7)**: 699-731.

DHOLWANI, K.K.; SALUIA A.K.; GUPTA, A.R.; SHAH, D.R. 2008. A review on plant-derived natural products and their analogs with anti-tumor activity. **Indian Journal of Pharmacology**, **40 (2)**: 49-58.

DI STASI, L.C.; HIRUMA, C.A.; GUIMARÃES, E.M.; SANTOS, C.M. 1994. Medicinal plants popularly used in Brazilian Amazon. **Fitoterapia**, **65**: 529-540.

DUARTE, M.C.T.; FIGUEIRA, G.M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V.L.G.; DELARMELENA, C. 2005. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, **97 (2)**: 305-311.

DUBEY, V.S.; BHALLA, R.; LUTHRA, R. 2003. An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. **Journal of Biosciences**, **28 (5)**: 637-646.

DUDAREVA, N.; CSEKE, L.; BLANC, V.M.; PLCHERSKY, E. 1996. Evolution of floral scent in *Clarkia*: novel patterns of S-linalool synthase gene expression in the *C. breweri* flower. **The Plant Cell**, **8 (7)**: 1137-1148.

DUNCAN, R.E.; LAU, D.; EL-SOHEMY, A.; ARCHER, M.C. 2004. Geraniol and β -ionone proliferation, cell cycle progression and cyclin-dependent kinase 2 activity in MCF-7 breast cancer cells independent of effects on HMG-CoA reductase activity. **Biochemical pharmacology**, **68 (9)**: 1739-1747.

EARLE, J.S.L.; LUTHRA, R.; ROMANS, A.; ABRAHAM, R.; ENSOR, J.; YAO, H.; HAMILTON, S. R. 2010. Association of MicroRNA Expression with Microsatellite Instability Status in Colorectal Adenocarcinoma. **Journal of Molecular Diagnostics**, **12 (4)**: 433-40.

ELMORE, S. 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicol Pathol**, **35(4)**: 495–516.

ERDMANN, F.; LORTET-TIEULENT, J.; SCHÜZ, J.; ZEEB, H; GREINERT, R., BREITBART, E.; BRAY, F. 2012. International trends in the incidence of malignant melanoma 1953–2008—are recent generations at higher or lower risk?. **International Journal of Cancer**, **132 (2)**: 355-400.

FARAZI, T.; SPITZER, J.; MOROZOV, P.; TUSCHI, T. 2011. miRNAs in human cancer. **Journal of Pathology**, **223 (2)**: 102-115.

FOEKENS, J.A.; SIEUWERTS, A.M.; SMID, M.; LOOK, M.P.; WEERD, V.; BOERSMA, A.W.M.; KLIJN, J.G.M; WIEMER, E.A.C.; MARTENS, J.W.M. 2008. Four miRNAs associated with aggressiveness of lymph node-negative, estrogen receptor-positive human breast cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **105 (35)**: 13021-13026.

FOSTER, I. 2008. Cancer: A cell cycle defect. **Radiography**, **14(2)**: 144-149.

GARBE, C.; PERIS, K.; HAUSCHILD, A.; SAIAG, P.; MIDDLETON, M.; SPATZ, A.; GROB, J; MALVEHY, J.; NEWTON-BISHOP, J.; STRATIGOS, A.; PEHAMBERGER, H.; EGGERMONT, A.M. 2012. Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline – Update 2012. **European Journal of Cancer**, **48 (15)**: 2375-2390.

GARZON, R.; MARCUCCI, G.; CROCE, C.M. 2010. Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. **Nature Reviews Drug Discovery**, **9**:775-789.

GIRÓN, L.M.; CÁCERES, A. 1994. **Técnicas básicas para el cultivo y procesamiento de plantas medicinales**. CEMAT. Guatemala: 51-52.

GRAINGE, M.; AHMED, S. 1988. **Handbook of plants with pest-control properties**. Wiley, New York, 1398p.

GREGG, R.G.; DAVIDSON, M.; WILCE, P.A. 1986. Cholesterol synthesis and hmg coa reductase activity during hepatocarcinogenesis in rats. **International Journal of Biochemistry**, **18 (4)**:389-393.

GU, J.Q.; GILLS, J.J.; PARK, E.J.; MATA-GREENWOOD, E.; HAWTHORNE, M.E.; AXELROD, F.; CHAVEZ, P.I.; FONG, H.H.S.; MEHTA, R.G.; PEZZUTO, J.M.; KINGHORN, A.D. 2002. Sesquiterpenoids from *Tithonia diversifolia* with potential cancer chemopreventive activity. ***Journal of Natural Products***, 65 (4): 532–536.

HANAHAN, D.; WEINBERG, D. R. 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. ***Cell***, 144(5): 646–674.

HE, L.; MO, H.; HADISUSILO, S.; QURESHI, A.A.; ELSON, C.E. 1997. Isoprenoids Suppress the Growth of Murine B16 Melanomas In Vitro. ***The Journal of Nutrition***, 127: 668–674.

HENNEBELLE, T.; SAHPAZ, S.; JOSEPH, H.; BAILLEUL, F. 2008. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. ***Journal of Ethnopharmacology***, 116 (2): 211-222.

HUANG, Z.; HUANG, D.; NI, S.; PENG, Z.; SHENG, W.; DU, X. 2010. Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer. ***International Journal of Cancer***, 127, (1): 118–126.

HUSSAIN, A.I.; ANWAR, F.; NIGAM, P.S.; ASHRAF, M.; GILANI, A.H. 2010. Seasonal variation in content, chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of essential oils from four *Mentha* species. ***Journal of the Science of Food and Agriculture***, 90 (11): 1827-1836.

HUTCHINGS, A.; VAN STADEN, J. 1994. Plants used for stress-related ailments in traditional Zulu, Xhosa and Sotho medicine. Part I: Plants used for headaches. ***Journal of Ethnopharmacology***, 43 (2): 89-124.

IJIMA, Y.; GANG, D.R.; FRIDMAN, E.; LEWINSOHN, E.; PICHERSKY, E. 2004. Characterization of geraniol synthase from the peltate glands of sweet basil. ***Plant Physiology***, 134 (1): 370-379.

INCA, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. 2011. **Estimativa 2012 : incidência de câncer no Brasil**. INCA, Brasil, Rio de Janeiro, 118p.

JOHNSON, S.M.; GROSSHANS, H.; SHINGARA, J.; BYROM, M.; JARVIS, R.; CHENG, A.; LABOURIER, E.; REINERT, K.L.; BROWN, D.; SLACK, F.J. 2005. RAS is regulated by the let-7 MicroRNA family. ***Cell***, 120 (5): 635-647.

JOO, J.H.; JETTEN, A.M. 2010. Molecular mechanisms involved in farnesol-induced apoptosis. **Cancer Letters**, **287 (2)**: 123-135.

JOO, J.H.; LIAO, G.; COLLINS, J.B.; GRISSOM, S.F.; JETTEN, A.M. 2007. Farnesol-induced apoptosis in human lung carcinoma cells is coupled to the endoplasmic reticulum stress response. **Cancer research**, **67 (16)**: 7929-36.

KAHNG, L.S. 2010. Genetic aspects of non-polypoid colorectal neoplasms. **Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America**, **20 (3)**: 573-578.

KANAAN, Z.; RAI, S.N.; EICHENBERGER, M.R.; BARNES, C.; DWORKIN, A.M.; WELLER, C.; COHEN, E.; ROBERTS, H.; KESKEY, B.; PETRAS, R.E.; CRAWFORD, N.P.S.; GALANDIUK, S. 2012. Differential microRNA expression tracks neoplastic progression in inflammatory bowel disease-associated colorectal cancer. **Human Mutation**, **33 (3)**: 551-560.

KARP, F.; MIHALIAK, C.A.; HARRIS, J.L.; CROTEAU, R. 1990. Monoterpene biosynthesis: specificity of the hydroxylations of (-)-limonene by enzyme preparations from peppermint (*Mentha piperita*), spearmint (*Mentha specata*) and perilla (*Perilla frutescens*) leaves. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, **276 (1)**: 219-226.

KIM, J.H.; KANG, M.J.; PARK, C.U.; KWAK, H.J. HWANG, Y. KOH, G.Y. 1999. Amplified CDK2 and cdc2 activities in primary colorectal carcinoma. **Cancer**, **85 (3)**: 546-553.

KIM, S.H.; BAE, H.C.; PARK, E.J.; LEE, C.R.; KIM, B.J.; LEE, S.; PARK, H.H.; KIM, S.J.; SO, I.; KIM, T.W.; JEON, J.H. 2011. Geraniol inhibits prostate cancer growth by targeting cell cycle and apoptosis pathways. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, **407**: 129-134.

KINGHORN, A.D.; FARNSWORTH, N.R.; SOEJARTO, D.D.; CORDELL, G.A.; PEZZUTO, J.M.; UDEANI, G.O.; WANI, M.C.; WALL, M.E.; NAVARRO, H.A.; KRAMER, R.A.; MENENDEZ, A.T.; FAIRCHILD, C.R.; LANE, K.E.; FORENZA, S.; VYAS, D.M.; LAM, K.S.; SHU, Y.Z. 1999. Novel strategies for the discovery of plant derived anticancer agents. **Pure and Applied Chemistry**, **71(9)**: 1611-1618.

KIRANA, C.; MCINTOSH, G.H.; RECORD, I.R.; JONES, G.P. 2003. Antitumor activity of extract of *Zingiber aromaticum* and its bioactive sesquiterpenoid zerumbone. **Nutrition and Cancer**, **45 (2)**: 218-25.

KOMATSU, S.; ICHIKAWA, D.; TAKESHITA, H.; TSUJIURA, M.; MORIMURA, R.; NAGATA, H.; KOSUGA, T.; IITAKA, D.; KONISHI, H.; SHIOZAKI, A.; FUJIWARA, H.; OKAMOTO, K.; OTSUJI, E. 2011. Circulating microRNAs in plasma of patients with oesophageal squamous cell carcinoma. **British Journal of Cancer**, **105 (1)**: 104-11.

KULDA, V.; PESTA, M.; TOPOLCAN, O.; LISKA, V.; TRESKA, V.; SUTNAR, A.; RUPERT, K.; LUDVIKOVA, M.; BABUSKA, V.; HOLUBEC JR., L.; CERNY, R. 2010. Relevance of miR-21 and miR-143 expression in tissue samples of colorectal carcinoma and its liver metastases. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, **200 (2)**:154–160.

LEE, K.H. 1999. Anticancer drug design based on plant-derived natural products. **Journal of Biomedical Science**, **6**: 236-250.

LEE, K.H.; CHOI, S.U.; LEE, K.R. 2005 Sesquiterpenes from *Syneilesis palmata* and their cytotoxicity against human cancer cell lines *in vitro*. **Archives of Pharmacal Research**, **28 (3)**: 280-284.

LEITÃO, S.G.; CASTRO, O.; FONSECA, E.N.; JULIÃO, L.S.; TAVARES, E.S.; LEO, R.R.T.; VIEIRA, R.C.; OLIVEIRA, D.R.; LEITÃO, G.G.; MARTINO, V.; SULSEN, V.; BARBOSA, Y.A.G.; PINHEIRO, D.P.G.; SILVA, P.E.A.; TEIXEIRA, D.F.; JUNIOR, I.N.; LOURENÇO, M.C.S. 2006. Screening of central and south american plant abstracts for antimycobacterial activity by Alamar Blue test. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, **16 (1)**: 6-11.

LEITÃO, S.G.; OLIVEIRA, D.R.; SÜLSEN, V.; MARTINO, V.; BARBOSA, Y.G.; BIZZO, H.R.; LOPES, D.; VICCINI, L.F.; SALIMENA, F.R.G.; PEIXOTO, P.H.P.; LEITÃO, G.G. 2008. Analysis of the Chemical Composition of the Essential Oils Extracted from *Lippia lacunosa* Mart. & Schauer and *Lippia rotundifolia* Cham. (Verbenaceae) by Gas Chromatography and Gas Chromatography-Mass Spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, **19 (7)**:1388-1393.

LEMOS, T.L.G.; MATOS, F.J.A.; ALENCAR, J.W.; CRAVEIRO, A.A.; CLARK, A.M.; MCCHESENEY, J.D. 1990. Antimicrobial activity of essential oils of Brazilian Plants. **Phytotherapy Research**, **4 (2)**: 82-84.

LEVY, C.; KHALED, M.; ILIOPOULOS, D.; JANAS, M.M.; SCHUBERT, S.; PINNER, S.; CHEN, P.H.; LI, S.; FLETCHER, A.L.; YOKOYAMA, S.; SCOTT, K.L.; GARRAWAY, L.A.; SONG, J.S.; GRANTER, S.R.; TURLEY, S.J.; FISHER, D.E.; NOVINA, C.D. 2010. Intronic miR-211 assumes the tumor suppressive function of its host gene in melanoma. **Molecular Cell**, **40 (5)**: 841–849.

LI, T.; MORGAN, M. J.; CHOKSI, S.; ZHANG, Y.; KIM, Y.; LIU, Z. 2010. MicroRNAs modulate the noncanonical transcription factor NF-kappaB pathway by regulating expression of the kinase IKKalpha during macrophage differentiation. **Nature immunology**, **11(9)**: 799-805.

LIU, L.; LASSAM, N. J.; SLINGERLAND, J. M.; BAILEY, D.; COLE, D.; JENKINS, R.; HOGG, D. 1995. Germline p16INK4A mutation and protein dysfunction in a family with inherited melanoma. **Oncogene**, **11 (2)**: 405-412.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. 2002. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Instituto Plantarum, Nova Odessa, SP, 512p.

LOWE, S. W.; LIN, A. W. 2000. Apoptosis in cancer. **Carcinogenesis**, **21(3)**: 485-495.

LUJAMBIO, A.; CALIN, G.A.; VILLANUEVA, A.; ROPERO, S.; SÁNCHEZ-CÉSPEDES, M.; BLANCO, D.; MONTUENGA, L.M.; ROSSI, S.; NICOLOSO, M.S.; FALLER, W.J.; GALLAGHER, W.M.; ECCLES, S.A.; CROCE, C.M.; ESTELLER, M. 2008. A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **105 (36)**: 13556–13561.

MA, L.; YOUNG, J.; PRABHALA, H.; PAN, E.; MESTDAGH, P.; MUTH, D.; TERUYA-FELDSTEIN, J.; REINHARDT, F.; ONDER, T.T.; VALASTYAN, S.; WESTERMANN, F.; SPELEMAN, F.; VANDESOMPELE, J.; WEINBERG, R.A. 2010. miR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis. **Nature Cell Biology**, **12 (3)**: 247-256.

MACHIDA, K.; TANAKA, T. 1999. Farnesol-induced generation of reactive oxygen species dependent on mitochondrial transmembrane potential hyperpolarization mediated by F0F1-ATPase in yeast. **FEBS (Federation of European Biochemical Societies) Letters**, **462**: 108-112.

MACHIDA, K.; TANAKA, T.; FUJITA, K.I.; TANIGUCHI, M. 1998. Farnesol-induced generation of reactive oxygen species via indirect inhibition of the mitochondrial electron transport chain in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, **180 (17)**: 4460-4465.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. 2007. Cell cycle kinases in cancer. **Current Opinion in Genetics & Development**, **17(1)**: 60-65.

MARKOWITZ, S.D.; BERTAGNOLLI, M.M. 2009. Molecular basis of colorectal cancer. **New England Journal of Medicine**, **361 (25)**: 2404-2460.

MASTELIĆ, J.; JERKOVIĆ, I.; BLAZEVIĆ, I.; POLJAK-BLAZI, M.; BOROVIĆ, S.; IVANCIĆ-BAĆE, I.; SMRECKI, V.; ZARKOVIĆ, N.; BRCIĆ-KOSTIC, K.; VIKIĆ-TOPIĆ, D.; MÜLLER, N. 2008. Comparative study on the antioxidant and biological activities of carvacrol, thymol, and eugenol derivatives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **56 (11)**: 3989-3996.

MCANALLY, J.A.; JUNG, M.; MO, H. 2003. Farnesyl-*O*-acetylhydroquinone and geranyl-*O*-acetylhydroquinone suppress the proliferation of murine B16 melanoma cells, human prostate and colon adenocarcinoma cells, human lung carcinoma cells, and human leukemia cells. **Cancer Letters**, **202 (2)**:181-192.

MCGARVEY, D.J.; CROTEAU, R. 1995. Terpenoid metabolism. **The Plant Cell**, **7 (7)**:1015-1026.

MENDES, M. D. S. 2007. **Caracterização química e molecular de espécies das famílias Lamiaceae e Apiaceae da flora aromática de Portugal. 2007.** Dissertação de Mestrado, Universidade de Lisboa, Portugal, Lisboa, 59p.

MESA-ARANGO, A.C.; MONTIEL-RAMOS, J.; ZAPATA, B.; DURÁN, C.; BETANCUR-GALVIS, L.; STASHENKO, E. 2009. Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **104 (6)**: 878-884.

MICHAEL, M. Z; O' CONNOR, S.M.; PELLEKAAN, N.G.H.; YOUNG, G.P; JAMES, R.J. 2003. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. **Molecular Cancer Research**, **1 (12)**: 882-891.

MINAYO, M.C.S. 2012. O envelhecimento da população brasileira e os desafios para o setor saúde. **Cadernos de Saúde Pública**, **28 (2)**: 208-209.

MO, H.; ELSON, C.E. 2004. Studies of the isoprenoid-mediated inhibition of mevalonate synthesis applied to cancer chemotherapy and chemoprevention. **Experimental Biology and Medicine**, **229 (7)**: 567-585.

MOLDENKE, H.N. 1965. Materials toward a monograph of the genus *Lippia*. I. **Phytologia**, **12**: 48-71.

MONTEIRO, M.V.B.; LEITE, A.K.R.M.; BERTINI, L.M.; MORAIS, S.M.; NUNES-PINHEIRO, D.C.S. 2007. Topical anti-inflammatory gastroprotective and antioxidant effects of the essential oil of *Lippia sidoides* Cham. leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, **111 (2)**: 378-382.

MONZO, M.; NAVARRO, A.; MORENO, J.; MARTINEZ, F.; BANDRES, E.; DIAZ, T.; ARTELLS, R.; MARTINEZ, A.; BALANGUÉ, O.; GARCIA-FONCILLAS, J. 2008. Overlapping expression of microRNAs in human embryonic colon and colorectal cancer. **Cell Research**, **18 (8)**: 823-833.

MOREIRA, M.M. 2003. Envelhecimento da população brasileira e migrações. **Políticas Públicas e Sociedade**, **5**: 7-16.

MORTON, J.F. 1981. **Atlas of medicinal plants of middle America**. Springfield, Mincis. USA, 1: 745-750.

MUELLER, D.W.; BOSSERHOFF, A.K. 2009. Role of miRNAs in the progression of malignant melanoma. **British Journal of Cancer**, **101 (4)**: 551-556.

NEVES, F.J.; KOIFMAN, R.J.; MATTOS, I.E. 2006. Mortalidade por câncer de cólon e reto e consumo alimentar em capitais brasileiras selecionadas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, **9 (1)**: 112-120.

NG, E.K.O.; CHONG, W.W.S.; JIN, H.; LAM, E.K.Y.; SHIN, V. Y.; YU, J.; POON, T.C.W.; NG, S.S.M.; SUNG, J.J.Y. 2009. Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: a potential marker for colorectal cancer screening. **GUT An International Journal of Gastroenterology and Hepatology**, **58 (10)**: 1375-1381.

O'DONNELL, K.A.; WENTZEL, E.A.; ZELLER, K.I.; DANG, C.V.; MENDELL, J.T. 2005. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. **Nature**, **435**: 839-843.

OLIVEIRA, D.R.; LEITÃO, G.G.; SANTOS, S.S.; BIZZO, H.R.; LOPES, D.; ALVIANO, C.S.; LEITÃO, S.G. 2006. Ethnopharmacological study of two *Lippia* species from Oriximiná, Brasil. **Journal of Ethnopharmacology**, **108 (1)**: 103-108.

OLIVEIRA, V.C.S.; MOURA, D.M.S.; LOPES, J.A.D.; ANDRADE, P.P; SILVA, N.H.; FIGUEIREDO, R.C.B.Q. 2009. Effects of essential oils from *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., *Lippia sidoides* Cham., and *Ocimum gratissimum* L. on growth and ultrastructure of *Leishmania chagasi* promastigotes. **Parasitology research**, **104 (5)**: 1053-1059.

ONG, T.P.; HEIDOR, R.; CONTI, A.; DAGLI, M.L.Z.; MORENO, F.S. 2006. Farnesol and geraniol chemopreventive activities during the initial phases of hepatocarcinogenesis involve similar actions on cell proliferation and DNA damage, but distinct actions on apoptosis, plasma cholesterol and HMGCoA reductase. **Carcinogenesis**, **27 (6)**: 1194-1203.

OUYANG, L; SHI, Z; ZHAO, S.; WANG, F. T.; ZHOU, T.T.; LIU, B.; BAO, J. K. 2012. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. **Cell Proliferation**, **45(6)**: 487-498.

PARK, H.W.; CHOI, S.U.; BAEK, N.I.; KIM, S.H; EUN, J.S.; YANG, J.H.; KIM, D.K. 2006. Guaiane Sesquiterpenoids from *Torilis japonica* and Their Cytotoxic Effects on Human Cancer Cell Lines. **Archives of Pharmacal Research**, **29 (2)**: 131-134.

PASCUAL, M.E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; SÁNCHEZ, M.D.; VILLAR, A. 2001a. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, **76 (3)**: 201-214.

PASCUAL, M.E.; SLOWING, K.; CARRETERO, M.E.; VILLAR, A. 2001b. Antiulcerogenic activity of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **IL Farmaco**, **56 (5-7)**: 501-504.

PFAFFL, M.W.; HORGANL, G.W.; DEMPFLER, L. 2002. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, **30 (9)**: e36.

PHILIPODOU, D.; SCHMITT, M.; MOSER, D. 2010. Signatures of MicroRNAs and Selected MicroRNA Target Genes in Human Melanoma. **Cancer Research**, **70 (10)**: 4163-4173.

RAMOS, A.; VISOZO, A.; PILOTO, J.; GARCÍA, C.A.; RIVERO, R.R. 2003. Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in Cuban medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, **87 (2-3)**: 241-246.

RIOJA, A.; PIZZEY, A.R.; MARSON, C.M.; THOMAS, N.S.B. 2000. Preferential induction of apoptosis of leukaemic cells by farnesol. **FEBS (Federation of European Biochemical Societies) Letters**, **467**: 291-295.

SALIMENA-PIRES, F.R. 1991. **Verbenaceae da serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil**. Dissertação Acadêmica (Mestrado em Botânica). Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, 302 p.

SANDERS, R.W. 2001. The genera of Verbenaceae in the southeastern United States. **Harvard Papers in Botany**, **5 (2)**: 303-358.

SARVER, A.L.; FRENCH, A.J.; BORRALHO, P.M.; THAYANITHY, V.; OBERG, A.L.; SILVERSTEIN, K, A. T.; MORLAN, B. W.; RISKA, S. M.; BOARDMAN, L. A.; CUNNINGHAM, J. M.; SUBRAMANIAN, S.; WANG, L.; SMYRK, T. C.; RODRIGUES, C. M. P.; THIBODEAU, S. N.; STEER, C. J. 2009. Human colon cancer profiles show differential microRNA expression depending on mismatch repair status and are characteristic of undifferentiated proliferative states. **BMC Cancer**, **9 (401)**: 1-15.

SATZGER, I.; MATTERN, A.; KUETTLER, U.; WEINSPACH, D.; NIEBUHR, M.; GUTZMER, R. 2012. microRNA-21 is upregulated in malignant melanoma and influences apoptosis of melanocytic cells. **Experimental Dermatology**, **21(7)**: 509–514.

SATZGER, I.; MATTERN, A.; KUETTLER, U.; WEINSPACH, D.; VOELKER, B.; KAPP, A.; GUTZMER, R. 2010. MicroRNA-15b represents an independent prognostic parameter and is correlated with tumor cell proliferation and apoptosis in malignant melanoma. **International Journal of Cancer**, **126**: 2553-2562.

SCHEPELER, T.; REINERT, J.T.; OSTENFELD, M.S.; CHRISTENSEN, L.L.; SILAHTAROGLU, A.N.; DYRSKJOT, L.; WIUF, C.; SORENSEN, F.J.; KRUIHOFFER, M.; LAURBERG, S.; KAUPPINEN, S.; ORNTOFT, T.F.; ANDERSEN, C.L. 2008. Diagnostic and prognostic microRNAs in stage II colon cancer. **Cancer Research**, **68(15)**: 6416-24.

SEGURA, M.F.; BILITSKAYA-LÉVY, I.; ROSE, A.E. 2010. Melanoma MicroRNA Signature Predicts Post-Recurrence Survival. **Clinical Cancer Research**, **16 (5)**: 1577-1586.

SHOFF, S.M.; GRUMMER, M.; YATVIN, M.B.; ELSON, C.E. 1991. Concentration-dependent increase of murine P388 and B16 population doubling time by acyclic monoterpene geraniol. **Cancer Research**, **51**: 37-42.

SICHERI, R.; EVERHART, J.E.; MENDONÇA, G.A.S. 1996. Diet and mortality from common cancers in Brazil: an ecological study. **Cadernos de Saúde Pública**, **12 (1)**: 53-59.

SILVA, P.S. 2008. **Verbenaceae da serra do Cipó: aspectos biossistemáticos, químicos e farmacológicos**. Dissertação Acadêmica (Mestrado em Ciências Biológicas), Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Juiz de Fora, MG, 201 p.

SINGULANI, J.L.; SILVA, P.S.; RAPOSO, N.R.B.; SIQUEIRA, E.P.; ZANI, C.L.; ALVES, T.M.A.; VICCINI, L.F. 2012. Chemical composition and antioxidant activity of *Lippia* species. **Journal of Medicinal Plants Research**, **6 (27)**:4416-4422.

SOUSA, A.; GATTASS, C. R.; ALVIANO, D. S.; ALVIANO, C. S.; BLANK, A. F.; ALVES, P. B. 2004. *Melissa officinalis* L. essential oil: antitumoral and antioxidant activities. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, **56 (50)**: 677–681.

STARK, M.S.; TYAGI, S.; NANCARROW, D.J.; BOYLE, G.M.; COOK, A.L.; WHITEMAN, D.C.; PARSONS, P.G.; SCHMIDT, C.; STURM, R.A.; HAYWARD, N.K. 2010. Characterization of the Melanoma miRNAome by Deep Sequencing. **PloS one**, **5 (3)**:1-9.

SUN, S.; DU, G.J.; QI, L.W.; WILLIAMS, S.; WANG, C.Z.; YUAN, C.S. 2010. Hydrophobic constituents and their potential anticancer activities from Devil's Club (*Oplopanax horridus* Miq.). **Journal of Ethnopharmacology**, **132 (1)**: 280-285.

TACHIBANA, K. K.; GONZALEZ, M.A.; COLEMAN, N. 2005. Cell-cycle-dependent regulation of DNA replication and its relevance to cancer pathology. **Journal of Pathology**, **205 (2)**: 123-129.

TATMAN, D.; MO, H. 2002. Volatile isoprenoid constituents of fruits, vegetables and herbs cumulatively suppress the proliferation of murine B16 melanoma and human HL-60 leukemia cells. **Cancer Letters**, **175 (2)**: 129-139.

TAVARES, E.S.; JULIÃO, L.S.; LOPES, D.; BIZZO, H.R.; LAGE, C.L.S.; LEITÃO, S.G. 2005 Análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) E. Br. (Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes. **Revista Brasileira de Farmacognosia** **15 (1)**: 1-5.

TERBLANCHÉ, F.C.; KORNELIUS, G. 1996. Essential oil constituents of the genus *Lippia* (Verbenaceae). **Journal of Essential Oil Research**, **8 (5)**: 471–485.

VENTURA, A.; JACKS, T. 2009. MicroRNAs and cancer: short RNAs go a long way. **Cell**, **136**, (4): 586-591.

VERAS, R. 2009. Envelhecimento populacional contemporâneo: demandas, desafios e inovações. **Revista de Saúde Pública**, **43** (3): 548-554.

VERMEULEN, K.; VAN BOCKSTAELE, D.R.; BERNEMAN, Z.N. 2003. The cell cycle : a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Proliferation**, **36** (3): 131-149.

VICCINI, L.F.; COSTA, D.C.S.; MACHADO, M.A.; CAMPOS, A.L. 2004. Genetic diversity among nine species of *Lippia* (Verbenaceae) based on RAPD markers. **Plant Systematics and Evolution**, **246**: 1-8.

VICCINI, L.F.; PIERRE, P.M.O.; PRAÇA, M.M.; COSTA, D.C.S; SOUSA, S.M.; PEIXOTO, P.H.P.; SALIMENA, F.R.G. 2006. Chromosome numbers in the genus *Lippia*. **Plant Systematics and Evolution**, **256**: 171-178.

VIEIRA, R.F. 1999. **Conservation of Medicinal and Aromatic Plants in Brazil**. In: J. Janick (ed.), Perspectives on new crops and new uses. J. Janick (ed.), ASHS Press, Alexandria, VA.

VIROS, A.; FRIDLYAND, J.; LASITHIOTAKIS, K.; GARBE, C., PINKEL, D.; BASTIAN, B.C. 2008. Improving Melanoma Classification by Integrating Genetic and Morphologic Features. **PLoS MEDICINE**, **5** (6): 941-952.

VISONE, R.; RUSSO, L.; PALLANTE, P.; DE MARTINO, I.; FERRARO, A.; LEONE, V.; BORBONE, E.; PETROCCA, F.; ALDER, H.; CROCE, C. M.; FUSCO, A. 2007. MicroRNAs (miR)-221 and miR-222, both overexpressed in human thyroid papillary carcinomas, regulate p27Kip1 protein levels and cell cycle. **Endocrine-Related Cancer**, **14**(3): 791–798.

VOLINIA, S.; CALIN, G. A.; LIU, C.; AMBS, S.; CIMMINO, A.; PETROCCA, F.; VISONE, R.; IORIO, M.; ROLDO, C; FERRACIN, M.; PRUEITT, R. L.; YANAIHARA, N.; LANZA, G.; SCARPA, A.; VECCHIONE, A.; NEGRINI, M.; HARRIS, C. C.; CROCE, C. M. 2006. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **103**(7): 2257-61.

WILLIAMS, G.H.; STOEBER, K. 2012. The cell cycle and cancer. **Journal of Pathology**, **226(2)**: 352–364.

WINTER, J.; JUNG, S.; KELLER, S.; GREGORY, R.I.; DIEDERICHS, S. 2009. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. **Nature Cell Biology**, **11 (3)**: 228-234.

WISEMAN, D.A.; WERNER, S.R.; CROWELL, P.L. 2007. Cell cycle arrest by isoprenoids perillyl alcohol, geraniol and farnesol is mediated by p21^{Cip1} and p27^{Kip1} in human pancreatic adenocarcinoma cells. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, **320 (3)**:1163-1170.

WORTHLEY, D.L.; LEGGETT, B.A. 2010. Colorectal cancer: molecular features and clinical opportunities. **The Clinical Biochemist Reviews**, **31 (2)**: 31-39.

WÜNSCH FILHO, V.; MONCAU, J.E. 2002. Mortalidade por câncer no Brasil 1980-1995: padrões regionais e tendências temporais. **Revista da Associação Médica Brasileira**, **48 (3)**: 250-257.

XI, Y.; FORMENTINI, A.; CHIEN, M.; WEIR, D. B.; RUSSO, J. J.; JU, J.; KORNMANN, M.; JU, J.; 2006. Prognostic Values of microRNAs in Colorectal Cancer. **Biomarker insights**, **2 (251)**: 113-121.

XU, Y.; BRENN, T.; BROWN, E.R.S.; DOHERTY, V.; MELTON, D.W. 2012. Differential expression of RNAs during melanoma progression: miR-200c, miR-205 and miR-211 are downregulated in melanoma and act as tumor suppressors. **British Journal of Cancer**, **106 (3)**: 553-561.

YU, S.G.; HILDEBRANDT, L.A.; ELSON, C.E. 1995. Geraniol, an inhibitor of mevalonate biosynthesis, suppresses the growth of hepatomas and melanomas transplanted to rats and mice. **The Journal of Nutrition**, **125**: 2763-2767.

ZOGHBI, M.G.B.; ANDRADE, E.H.A.; SANTOS, A.S.; SILVA, M.H.L.; MAIA, J.G.S. 1998. Essential Oils of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br Growing Wild in the Brazilian Amazon. **Flavour and Fragrance Journal**, **13 (1)**: 47-48.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Viabilidade celular obtida após tratamento com os óleos de *L. alba* quimiotipos geraniol e carvona, *L. sisoides*, *L. salviifolia*, *L. rotundifolia* e *L. lacunosa* e com o controle positivo 5-fluorouracila em células da linhagem de tecido normal de ovário CHO-K1.

