

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS
BIOATIVOS

ANA LUIZA DE OLIVEIRA LOPES

**Efeito antitumoral *in vitro* do óleo essencial de *Lippia microphylla*
Cham (Verbenaceae)**

João Pessoa – PB
2021

ANA LUIZA DE OLIVEIRA LOPES

**Efeito antitumoral *in vitro* do óleo essencial de *Lippia microphylla*
Cham (Verbenaceae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, para obtenção do título de mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Área de concentração: FARMACOLOGIA

ORIENTADORA:

Prof^a. Dr^a. Marianna Vieira Sobral

João Pessoa – PB

2021

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

L837e Lopes, Ana Luiza de Oliveira.

Efeito antitumoral in vitro do óleo essencial de *Lippia microphylla* Cham (Verbenaceae) / Ana Luiza de Oliveira Lopes. - João Pessoa, 2021.

98 f. : il.

Orientação: Marianna Vieira Sobral.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Produtos naturais. 2. Citotoxicidade. 3. *Lippia microphylla*. 4. Atividade antitumoral. 5. Melanoma. I. Sobral, Marianna Vieira. II. Título.

UFPB/BC

CDU 547.9:615.3(043)

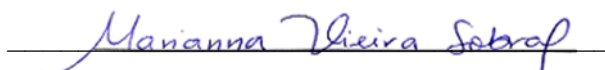
ANA LUIZA DE OLIVEIRA LOPES

**Efeito antitumoral *in vitro* do óleo essencial de *Lippia microphylla* Cham
(Verbenaceae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, como pré-requisito para obtenção do título de mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, área de concentração Farmacologia.

Data e local da defesa: aprovada em 20 de agosto de 2021, João Pessoa, Paraíba, Brasil.

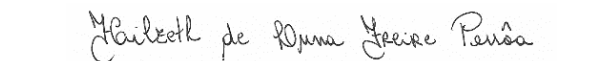
COMISSÃO EXAMINADORA



Prof^a. Dr^a. Marianna Vieira Sobral
(Orientador/Presidente) - Universidade Federal da Paraíba



Prof^a. Dr. Reinaldo Nobrega de Almeida
(Examinador interno) - Universidade Federal da Paraíba



Prof. Dr^a. Hilzeth de Luna
(Examinador interno) - Universidade Federal da Paraíba

A minha mãe, Fátima, por todo seu
amor e esforço que me
impulsionaram a voar



AGRADECIMENTOS

A **Deus** pelo dom da vida, por toda força concebida para resistir aos piores momentos e por todas as bênçãos alcançadas até aqui. Obrigada Senhor! A minha mãezinha **Maria** que sempre intercedeu pelos seus filhos e escuta nossas preces.

A minha mãe, **Maria de Fatima**, por ser minha maior inspiração de força e amor. Obrigada por todo amor, carinho e dedicação, pelas renúncias e esforços que me permitiram chegar até aqui. Ao meu pai **Jandui** que mesmo longe ajudou-me inúmeras vezes mostrando que estudar era o melhor caminho.

As minhas irmãs **Naide e Patrícia** que estão presentes em todos os momentos da minha vida, mesmo agora morando em casas separadas. Eu tive o privilégio de já nascer com melhores amigas. Obrigada por existirem, eu não sei o que seria de mim sem vocês.

Ao meu irmão **Claudinho**, que sempre esteve perto me ajudando onde pudesse, e sempre me motivou a estudar. Agradeço também a minha cunhada **Mariselma**, por todo companheirismo e cuidado durante essa jornada.

Ao meu melhor amigo e amado esposo **Sirliel Veloso**, pela presença diária, incentivo, amor, companheirismo e paciência em todos os momentos. Meu churrasqueiro favorito, você consegue arrancar meus melhores sorrisos e me dá forças para continuar durante essa difícil jornada que escolhi seguir. Te amo muito!!

A minha segunda família: Meus cunhados **Diego e Thyago** que se tornaram irmãos, amo dividir a vida com vocês. Aos meus sogros **Rosilda e Veloso**, me recebem com todo amor do mundo em sua casa e por todo cuidado ao longo desses anos. Em especial a dona Rosilda, uma amiga de café da tarde, dona de um coração que exala generosidade.

As minhas cunhadas **Sheyla e Sirley** vivemos juntas momentos alegres e difíceis da pós-graduação, em áreas diferentes, mas com os mesmos aperreios. **Sirley** que é uma irmã pra mim, junto com **Letícia** que vive na minha cola e me faz lembrar como é bom ser criança carregando com si uma alegria contagiante.

A minha querida avó **Luiza Oliveira**, pelo exemplo de vida e deixar sempre as portas de sua casa abertas para nossa família, aos meus tios por sempre se fazerem presente e aos meus primos que sempre estão por perto, em especial a **Alan e Jaqueline**. Jack que divide momentos de felicidade, de aperreio e desespero nessa vida de concurseira sofrida que escolhemos. Ainda bem que tenho você!

As minhas amigas de infância **Renata, Mayara, Jayane e Paulinha**. Como é bom contar com vocês. Como tenho sorte em tê-las por perto durante toda minha vida. Amo vocês!!

A minha dupla de mestrado e vida, **Camyla**, eu não conseguiria todos esses resultados se não fosse pela sua parceria, ajuda e companheirismo, fizemos tudo juntas. Absolutamente tudo. Você é completamente diferente de mim e por isso nos completamos tão bem, agradeço pela sua vida e pela irmandade que construímos durante esses anos. Não poderia deixar de falar de **Sâmia**, que foi luz em muitos momentos, a ela recorri quando não sabia executar as metodologias, a ela recorri quando tive dúvida nos tratamentos dos resultados. E em todas as vezes ela me socorreu e ensinou, você tem um dom Sâmia e rezo para que almeje todos os seus sonhos.

Aos meus amigos da graduação **Ramon e Juliany** que estão sempre presentes na minha vida, tenho um carinho enorme por eles e como foi estranho passar tanto tempo na universidade sem a presença deles.

Aos amigos do laboratório **Daiana, Thais, Valgricia, Renata, Rafael e Rawny** com quem vivi anos de muito aperreio, mas de muita alegria. Vocês deixaram a caminhada mais leve e serei sempre amiga de vocês. Aos ic's **Paulo, Ramon, Kariny e Junior** que me ajudaram demais nesses anos e a **Ana Paula**, nossa técnica, maravilhosa que cuida do Oncofar como se fosse sua casa.

Gratidão a **Fátima**, que sempre nos ajudou nos milhares de experimentos no citômetro, sempre disponível a nos ajudar e nos ouvir com palavras gentis. Você se tornou uma amiga especial.

A Profa. **Marianna Sobral** pela inteira dedicação e ensinamentos transmitidos, por ter me acolhido quando ainda engatinhava e me transformar na aluna que sou hoje. Gratidão pelos aprendizados.

Aos professores **Reinaldo e Hilzeth** que aceitaram a difícil missão de avaliar e contribuir nesta dissertação.

A **Universidade Federal da Paraíba**, instituição pública, gratuita e de qualidade, responsável pelo meu crescimento e desenvolvimento profissional e pessoal. Torço para que, em um futuro próximo, a educação seja valorizada!

E a todos que, de maneira direta ou indireta, contribuíram para a realização desse sonho.

"Não fui eu que ordenei a você? Seja forte e corajoso! Não se apavore nem desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar"

Josué 1:9

LOPES, A.L.O. **Efeito antitumoral *in vitro* do óleo essencial de *Lippia microphylla* Cham (Verbenaceae).** 2021. 100f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – UFPB/ CCS, João Pessoa.

RESUMO

O câncer é um termo que se refere a um conjunto de doenças malignas caracterizadas pela proliferação descontrolada de células indiferenciadas, com capacidade de invasão e metástase. Várias modalidades de tratamento estão disponíveis, porém, sua efetividade é muitas vezes limitada pelo desenvolvimento de resistência e pela alta toxicidade. Produtos obtidos de plantas medicinais são uma importante fonte de novos agentes terapêuticos. Nesse contexto destacam-se os óleos essenciais, que são misturas complexas de substâncias voláteis, descritos na literatura com uma gama de efeitos biológicos. *Lippia microphylla* Cham. (Verbenaceae) é uma espécie aromática, cujo óleo essencial extraído das folhas possui relatos de atividade larvicida, antioxidante, antifúngica, antimicrobiana, citotóxica e antitumoral *in vivo* em modelo de sarcoma 180. Todavia, o mecanismo de ação deste óleo em linhagens de células tumorais humanas não foi descrito até o presente momento. Assim, esse trabalho buscou investigar a ação antitumoral *in vitro* do óleo essencial das folhas de *L. microphylla* (OE-LM). A citotoxicidade foi avaliada em linhagens de células tumorais (HCT-116, HeLa, MCF-7, PC-3, MDA-MB-231, SK-MEL-28) e não tumoral (HaCaT) humanas, por meio do ensaio de redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio). A linhagem tumoral mais sensível ao OE-LM foi a linhagem de melanoma SK-MEL-28, para a qual o óleo apresentou concentração inibitória 50% (CI₅₀) de $33,38 \pm 1,16 \mu\text{g/mL}$. Na linhagem não tumoral HaCaT, o valor de CI₅₀ foi de $58,73 \pm 1,10 \mu\text{g/mL}$. Para a droga padrão doxorrubicina (DOX), os valores de CI₅₀ foram de 4,0 e 0,28 μM , em células SK-MEL-28 e HaCaT, respectivamente. Com isso, foi possível determinar o índice de seletividade (IS), que mostrou que o OE-LM (IS: 1,75) foi mais seletivo para células SK-MEL-28 do que a DOX (IS: 0,07), em relação a ação em célula não tumoral HaCaT. Para investigar possíveis mecanismos de ação *in vitro* do OE-LM em células da linhagem SK-MEL-28 foram avaliados seus efeitos no ciclo celular, na indução apoptose e na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) nas concentrações equivalentes a CI₅₀ e o dobro (33 e 66 $\mu\text{g/mL}$). Na análise do ciclo celular, OE-LM induziu aumento significativo no pico sub-G1 ($p < 0,0001$), o que é indicativo de apoptose. Características morfológicas desse tipo de morte celular, como formação de *blebs* na membrana e corpos apoptóticos, foram observadas na análise por microscopia confocal. Em paralelo, na análise por citometria de fluxo, foi observado aumento significativo na quantidade de células marcadas com anexina V-FITC ($p < 0,0001$), o que confirma a indução de apoptose pelo óleo. Em adição, houve redução na produção de EROs, o que indica que o efeito antitumoral do OE-LM envolve uma ação antioxidante. Portanto, o OE-LM apresenta atividade antimelanoma *in vitro*, o que sugere sua potencialidade como um agente anticâncer.

Palavras-chave: Citotoxicidade. *Lippia microphylla*. Atividade antitumoral. Melanoma.

LOPES, A.L.O. *In vitro* antitumor effect of *Lippia microphylla* Cham essential oil (Verbenaceae) 2021. 100f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – UFPB/ CCS, João Pessoa.

ABSTRACT

Cancer is a term that refers to a set of malignant diseases characterized by the uncontrolled proliferation of undifferentiated cells, capable of invasion and metastasis. Several treatment modalities are available, but their effectiveness is often limited by the development of resistance and high toxicity. Products obtained from medicinal plants are an important source of new therapeutic agents. In this context, essential oils are highlighted, which are complex mixtures of volatile substances, described in the literature with a range of biological effects. *Lippia microphylla* Cham. (Verbenaceae) is an aromatic species whose essential oil extracted from the leaves has reports of larvicidal, antioxidant, antifungal, antimicrobial, cytotoxic and antitumor activity in vivo in a sarcoma 180 model. However, the mechanism of action of this oil in tumor cell lines human beings has not been described so far. Thus, this work aimed to investigate the in vitro antitumor action of the essential oil from *L. microphylla* leaves (OE-LM). Cytotoxicity was evaluated in human tumor (HCT-116, HeLa, MCF-7, PC-3, MDA-MB-231, SK-MEL-28) and non-tumor (HaCaT) cell lines through the reduction assay of MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide). The most sensitive tumor strain to OE-LM was the melanoma strain SK-MEL-28, for which the oil presented an inhibitory concentration 50% (IC₅₀) of $33.38 \pm 1.16 \mu\text{g/mL}$. In the non-tumor HaCaT lineage, the IC₅₀ value was $58.73 \pm 1.10 \mu\text{g/mL}$. For the standard drug doxorubicin (DOX), IC₅₀ values were 4.0 and 0.28 μM , in SK-MEL-28 and HaCaT cells, respectively. Thus, it was possible to determine the selectivity index (IS), which showed that the OE-LM (IS: 1.75) was more selective for SK-MEL-28 cells than the DOX (IS: 0.07), in relation to action on non-tumor cells HaCaT. To investigate possible in vitro mechanisms of action of OE-LM in cells of the SK-MEL-28 lineage, its effects on the cell cycle, apoptosis induction and production of reactive oxygen species (ROS) at concentrations equivalent to IC₅₀ and o double (33 and 66 $\mu\text{g/mL}$). In cell cycle analysis, OE-LM induced a significant increase in the sub-G₁ peak ($p < 0.0001$), which is indicative of apoptosis. Morphological characteristics of this type of cell death, such as formation of blebs in the membrane and apoptotic bodies, were observed in the analysis by confocal microscopy. In parallel, in the analysis by flow cytometry, a significant increase in the amount of cells labeled with annexin V-FITC ($p < 0.0001$) was observed, which confirms the induction of apoptosis by the oil. In addition, there was a reduction in the production of ROS production, which indicates that the antitumor effect of OE-LM involves an antioxidant action. Therefore, OE-LM has antimelanoma activity in vitro, which suggests its potential as an anticancer agent.

Keywords: Cytotoxicity. *Lippia microphylla*. Antitumor activity. Melanoma.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas da carcinogênese.....	19
Figura 2. Características biológicas do câncer.....	21
Figura 3. Fases e regulação do ciclo celular.....	23
Figura 4. Visão geral das vias de sinalização da apoptose e os efeitos da sinalização pró-sobrevivência, células imunes e microambiente tumoral	28
Figura 5. Sinalização induzida por ROS em células cancerígenas	32
Figura 6. <i>Lippia microphylla</i> Cham. (Verbenaceae).	38
Figura 7. Efeito do OE-LM e DXR sobre a viabilidade de células da linhagem SK-MEL-28 após 24, 48 e 72 horas de tratamento.....	54
Figura 8 - Efeito do tratamento (48 horas) com o OE-LM (33 e 66 µg/mL) e DXR (4,0 µM) na progressão do ciclo celular em células da linhagem SK-MEL-28.....	56
Figura 9A-B. Efeito do tratamento de 48 horas com o OE-LM (33 µg/mL) e DXR (4,0 µM) em células SK-MEL-28 duplamente marcadas com laranja de acridina e iodeto de propídeo.....	58
Figura 10. Efeito do tratamento de 48 horas com o OE-LM (33 µg/mL) e DXR (4,0 µM) em células SK-MEL-28 duplamente marcadas com laranja de acridina e iodeto de propídeo	60
Figura 11. <i>Dotplots</i> representativos de células SK-MEL-28 duplamente marcadas com Anexina V-FITC e iodeto de propídeo, após tratamento (48 horas) com OE-LM (33 e 66 µg/mL) e DXR (4,0 µM)	62
Figura 12 - Efeito após tratamento (48 horas) com OE-LM (33 e 66 µg/mL) e DXR (4,0 µM) em células SK-MEL-28 duplamente marcadas com Anexina V- FITC e iodeto de propídeo.....	63
Figura 13. Efeito do OE-LM (33 e 66 µg/mL) na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em células SK-MEL-28 após 48 horas de tratamento.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Constituintes químicos presentes no óleo essencial de *Lippia microphylla* Cham. (Verbenaceae) 40

Tabela 2. Citotoxicidade *in vitro* do óleo essencial das folhas de *Lippia microphylla* (OE-LM) 52

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Linhagens de células tumorais e não tumoral humanas.....45

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

5-FU	5-fluorouracila
AKT	Proteína quinase serina/treonina específica
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APAF1	Fator de ativação de protease associada à apoptose 1
BAD	<i>Bcl-2 antagonist of cell death</i>
BAK	<i>Bcl-2 antagonist killer 1</i>
BAX	<i>Bcl-2 associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B cell Lymphoma 2</i>
Bcl-xL	<i>Bcl-2 related gene long isoform</i>
bFGF	Fator de crescimento de fibroblastos básico
BID	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
BIM	<i>Bcl-2 interacting mediator of cell death</i>
BM	<i>Blebs</i> de membrana
CCEN	Centro de Ciências Exatas e da Natureza
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CDKs	Quinase dependente de Ciclina
CI50	Concentração que produz 50% de inibição no crescimento celular
CL50	Concentração letal média
DCFH-DA	fluoróforo 2',7'-diacetato diclorofluoresceína
DL50	Dose que causa 50% da letalidade dos animais
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DXR	Doxorrubicina
EGF	Fator de crescimento epidérmico
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
e.p.m.	Erro padrão da média
EROs	Espécies reativas de oxigênio
HaCaT	Linhagem celular de queratinócito humano (não tumoral)
HCT	Hematócrito
HCT-116	Linhagem celular de carcinoma colorretal humano
HeLa	Linhagem celular de colo do útero humano
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
IP	Iodeto de propídio

IPeFarM	Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos
IS	Índice de seletividade
LA	Laranja de acridina
MCF-7	Linhagem celular de adenocarcinoma de mama humano
MDA-MB-231	Linhagem celular de adenocarcinoma de mama humano
MMPs	Metaloproteinases da matriz
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio
NF-κB	Fator de transcrição nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
OE-LM	Óleo essencial de <i>Lippia microphylla</i>
PBS	Solução tampão fostato
PC-3	Linhagem celular de carcinoma de próstata humano
PPgPNSB	Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
Rb	Retinoblastoma
RNA	Ácido ribonucleico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SK-MEL-28	Linhagem celular de melanoma humano
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNC	Sistema Nervoso Central
SISGEN	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
TGF	Fator de crescimento transformante
TNF	Fator de necrose tumoral
UFPB	Universidade Federal da Paraíba

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
2.1	Aspectos gerais do câncer	17
2.2	Ciclo Celular.....	22
2.3	Apoptose	25
2.4	Estresse oxidativo no câncer	29
2.5	Farmacoterapia do câncer	33
2.6	<i>Lippia microphylla</i> : Família, gênero e espécies	36
3	OBJETIVOS.....	42
3.1	Objetivo geral	42
3.2	Objetivos específicos	42
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	44
4.1	Local da pesquisa.....	44
4.2	MATERIAL.....	44
4.2.1	Material botânico.....	44
4.2.2	Produto teste.....	44
4.2.3	Linhagens de células tumorais e não tumoral	45
4.3	MÉTODOS.....	45
4.3.1	Preparo da solução do óleo essencial de <i>L. microphylla</i> (OE-LM).....	45
4.3.2	Avaliação da citotoxicidade em células tumorais e não tumoral	46
4.3.3	Análise do ciclo celular.....	47
4.3.4	Avaliação da apoptose por laranja de acridina (LA) e iodeto de propídio (IP)	48
4.3.5	Avaliação da apoptose pela dupla marcação com Anexina V-FITC e iodeto de propídeo	48
4.3.6	Avaliação da quantificação de espécies reativas de oxigênio (EROs)...	49
4.4	Análise estatística.....	50
5	RESULTADOS.....	52
5.1	Citotoxicidade em células tumorais e não tumoral	52
5.1	Análise do ciclo celular	55
5.2	Avaliação da apoptose por laranja de acridina (LA) e iodeto de propídio (IP).....	56
5.3	Avaliação da apoptose pela dupla marcação com Anexina V-FITC e iodeto de propídeo (IP).....	60
5.4	Quantificação de espécies reativas de oxigênio	63
6	DISCUSSÃO	66
7	CONCLUSÕES	74
	REFERÊNCIAS	75

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O termo câncer abrange mais de 100 diferentes tipos de doenças malignas que apresentam algumas características em comum, como proliferação descontrolada, resistência à apoptose, desregulação energética celular, indução da angiogênese e capacidade de invadir tecidos e ocasionar metástases (INCA, 2020; HANAHAHAN; WEINBERG, 2011; ZAVYALOVA et al., 2019).

A mais recente estimativa mundial, aponta que em 2020 houve quase 10 milhões de mortes em todo mundo, dos quais os tipos mais presentes foram o câncer de mama, de pulmão, de cólon e reto, próstata e pele (FERLAY et al., 2021). No Brasil, ocorrerão 625 mil casos novos de câncer para cada ano do triênio 2020-2022 (INCA, 2019). E, para agravar ainda mais, estudos mostram que pacientes com câncer que adquirem o coronavírus (COVID-19) apresentam o dobro da taxa de letalidade (VENKATESULU et al., 2021; PATHANIA et al., 2021). Esses dados mostram a magnitude do problema epidemiológico envolvendo o câncer, o que faz com que essa doença seja considerada um problema de saúde pública mundial.

Em relação ao tratamento do câncer diversas abordagens podem ser empregadas, como a quimioterapia, a radioterapia, a cirurgia, a terapia alvo, a imunoterapia, entre outras. Em alguns casos é necessário combinar mais de uma modalidade, porém, ainda assim, a efetividade dos tratamentos é muitas vezes limitada pelo desenvolvimento de quimiorresistência e pelo aparecimento de efeitos secundários graves, como alopecia, mielossupressão e náuseas e vômitos intensos (FEITELSON et al., 2015; MILLER et al., 2019; SMITH; PREWETT, 2017).

Então, considerando os dados epidemiológicos de incidência da doença, bem como a problemática envolvendo a efetividade de seu tratamento, pode-se inferir que as pesquisas de novas abordagens para somar no arsenal terapêutico na luta contra o câncer continuam emergentes no mundo, e, nesse cenário, se insere a pesquisa de produtos naturais. Considerando a coevolução planta-homem, essas representam uma fonte quase ilimitada de alimentos, fibras para roupas e drogas biologicamente ativas. Então, historicamente, plantas medicinais tem sido uma fonte importante de novos agentes terapêuticos (AMIRKIA; HEINRICH, 2015; MOSCA et al., 2021), a exemplo dos antineoplásicos utilizados clinicamente, paclitaxel — das espécies vegetais do gênero *Taxus* — e vincristina e vinblastina provenientes de *Catharanthus roseus* (FETT-NETO; DICOSMO, 2020; DAS et al., 2020).

Dentre a imensidão de produtos obtidos de plantas medicinais, destacam-se os óleos essenciais, que são caracterizados como extratos líquidos voláteis e lipofílicos oriundos do metabolismo secundário das plantas (ABERS et al., 2021; SHARIFI-RAD et al., 2017). Dados da literatura descrevem uma gama de atividades biológicas para óleos essenciais obtidos de diferentes espécies, tais como atividades antifúngica, antibacteriana, antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral, entre outras (CIMINO et al., 2021; JULIÃO et al., 2020; PEIXOTO et al., 2015).

Nessa conjuntura, pode-se destacar a espécie aromática *Lippia microphylla* Cham, que é uma planta rica em óleos essenciais, endêmica no Brasil, porém ainda é subexplorada (SIMÕES et al., 2018). Seus óleos voláteis são ricos em monoterpenos e apresentam atividade larvicida sobre larvas de *Aedes aegypti* (SANTIAGO et al., 2006), ação antifúngica e antibacteriana (RODRIGUES et al., 2011; SCHURT et al., 2012), e atividade antioxidante (DAVID et al., 2007). Ainda, estudos realizados pela equipe do Laboratório de Oncofarmacologia do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (ONCOFAR/PPgPNSB/CCS/UFPB) mostram que o óleo essencial extraído das folhas de *L. microphylla*, contendo timol, carvacrol e *p*-cimeno, apresenta efeito antitumoral *in vitro* em células das linhagens K562 (leucemia humana) e Sarcoma 180 (tumor murino), e *in vivo* em modelo de sarcoma 180 (XAVIER, 2011; XAVIER et al., 2015). Todavia, o efeito antitumoral em linhagens oriundas de outros tipos de tumores humanos, bem como possíveis mecanismos de ação antitumoral, não foram descritos até o momento.

Portanto, considerando estudos prévios que apontam o potencial antitumoral do óleo essencial de *Lippia microphylla*, esse trabalho se propôs a avaliar o efeito antitumoral *in vitro* do OE-LM em diferentes linhagens tumorais humanas, assim como investigar possíveis mecanismos de ação relacionados a interferência no ciclo celular, a indução de apoptose e a modulação do estado redox celular.

Fundamentação Teórica

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Aspectos gerais do câncer

O câncer é a doença genética mais complexa conhecida, com mutações implicadas em mais de 250 genes, que ocorre quando a informação no DNA celular é corrompida, levando a padrões anormais de expressão gênica acarretados por alterações genéticas e/ou epigenéticas (SAHU et al., 2020; NENCLARES; HARRINGTON, 2020). A célula alterada começa a manter uma sinalização proliferativa sustentada, gerando uma massa anormal, o que caracteriza um tumor, que pode ser então classificado como benigno ou maligno (KUMAR; SHARMA et al., 2015).

Os tumores benignos têm seu crescimento lento de forma organizada, expansivo e apresentam limites nítidos, além disso, assemelham-se com o tecido de origem e não possuem a capacidade de invadir tecidos vizinhos (KIGNEL, 2013). Já as neoplasias malignas caracterizam-se como células que sofrem sucessivas mitoses e são capazes de invadir tecidos vizinhos e provocar metástases, apresentando bordas não delimitadas, diferentes de seu tecido de origem, podendo ser resistentes ao tratamento e causar a morte do indivíduo acometido com a doença (POLO et al., 2017).

Os cânceres são classificados de acordo com os tecidos e os tipos celulares dos quais eles derivam. Os tumores malignos derivados de células epiteliais são denominados carcinomas, o tipo de câncer mais comum em humanos, chegando a 80% dos casos. Sarcomas são os tumores derivados do tecido conectivo ou de células musculares. Os cânceres que não se enquadram em nenhuma dessas duas amplas categorias incluem as várias leucemias e linfomas, derivados de leucócitos ou de seus precursores (células hematopoiéticas), assim como os cânceres derivados de células do sistema nervoso (SHIELDS, 2017; ROBERTSON et al., 2017).

O câncer tem sido uma doença que afeta a espécie humana há milhares de gerações, como demonstrado pela presença de um osteossarcoma em um fóssil de 1,7 milhões de anos na África do Sul (ODES et al., 2016). Outros relatos sugerem a presença de mieloma múltiplo, câncer de próstata e de mama em humanos entre 230

e 3000 a.C. (BINDER et al., 2014; KARPOZILOS; PAVLIDIS, 2004). Dessa forma, a existência do câncer em espécies humanas antes da modernização e da introdução de contaminantes sintéticos no ambiente e nas dietas tornam essa doença ainda mais intrigante (PETERS; GONZALEZ, 2018).

A incidência e a mortalidade por câncer vêm aumentando no mundo, em parte, pelo envelhecimento, pelo crescimento populacional, como também pela mudança na distribuição e na prevalência dos fatores de risco (BRAY et al., 2018), sendo caracterizado atualmente como a segunda principal causa de mortalidade no mundo (MOLEJON et al., 2020).

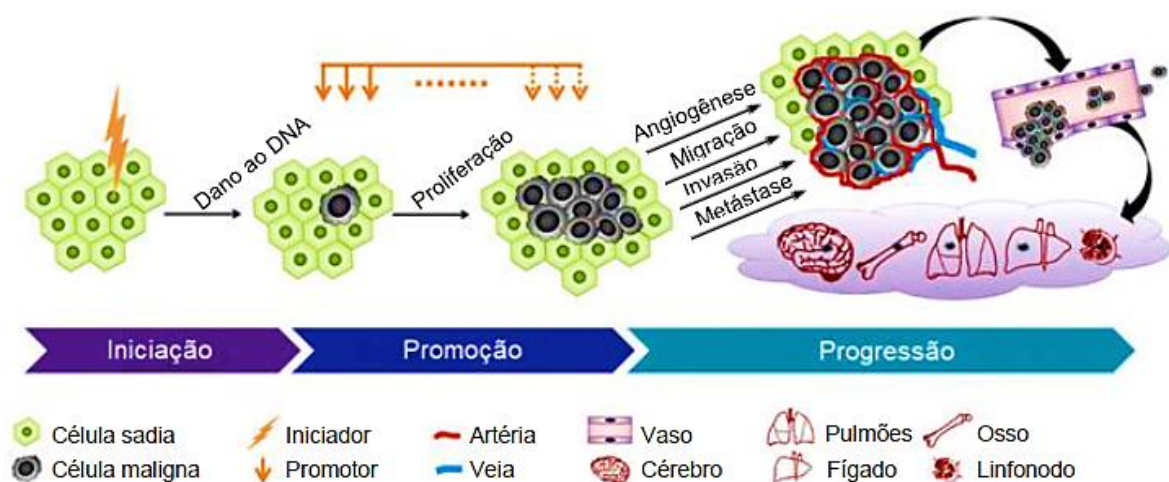
A mais recente estimativa mundial, aponta que em 2020 houve quase 10 milhões de morte em todo mundo, dos quais os tipos mais presentes foram o câncer de mama (2,26 milhões de casos), de pulmão (2,21 milhões de casos), de cólon e reto (1,93 milhão de casos), próstata (1,41 milhão de casos) e pele (1,20 milhão de casos) (FERLAY et al., 2021). Estimativas sugerem que em 2030, a carga global será 22,2 milhões de casos novos de câncer e 13,2 milhões de mortes em todo o mundo (FERLAY et al., 2021; OMS, 2018).

Já no Brasil, dados apontam que, para cada ano do triênio 2020-2022, ocorrerão 625 mil casos novos de câncer, dentre os quais o câncer de pele não melanoma será o mais incidente (177 mil), seguido pelos cânceres de mama e próstata (66 mil cada), cólon e reto (41 mil), pulmão (30 mil) e estômago (21 mil) (INCA, 2019).

A razão para o desenvolvimento dos diferentes tipos de neoplasias ainda permanece desconhecida, no entanto, algumas causas são estabelecidas e incluem fatores de risco intrínsecos e extrínsecos (ROMIEU; AMADOU; CHAJES, 2017). Os fatores intrínsecos são aqueles associados a mutações devido a erros na replicação do DNA, responsáveis por cerca de 10 - 30% dos casos de câncer, incluindo as mudanças hormonais extremas, a imunidade e os distúrbios genéticos herdados (TAN et al., 2016; WU et al., 2016). Já os fatores extrínsecos correspondem aos fatores ambientais — tais como, radiação ultravioleta e ionizante — assim como o estilo de vida do indivíduo, a citar o uso de tabaco, o consumo de álcool e o sedentarismo que promovem o acúmulo de alterações genéticas podendo desencadear a carcinogênese (ROMIEU; AMADOU; CHAJES, 2017; LANGEVIN; KELSEY, 2020; WU et al., 2016).

A carcinogênese caracteriza-se pelo processo de formação de tumores, e é dividida em diferentes fases, a saber: iniciação, promoção e progressão (CRUJEIRAS; LORENZO 2020; MINTIE et al., 2020). A fase de iniciação é marcada por um acúmulo de alterações genéticas e/ou epigenéticas transformando uma célula saudável em uma célula transformada (LANGEVIN; KELSEY, 2020). Em seguida, na fase de promoção, as células transformadas desenvolvem uma capacidade proliferativa maior que as células vizinhas, transformando-se em malignas, as quais podem evoluir para a terceira e última fase, que é a progressão. Nesta última fase, ocorre a multiplicação descontrolada e irreversível das células, tornando o tumor cada vez mais agressivo (HYNDMAN, 2016; PATTERSON et al., 2018) (Figura 1).

Figura 1. Etapas da carcinogênese.

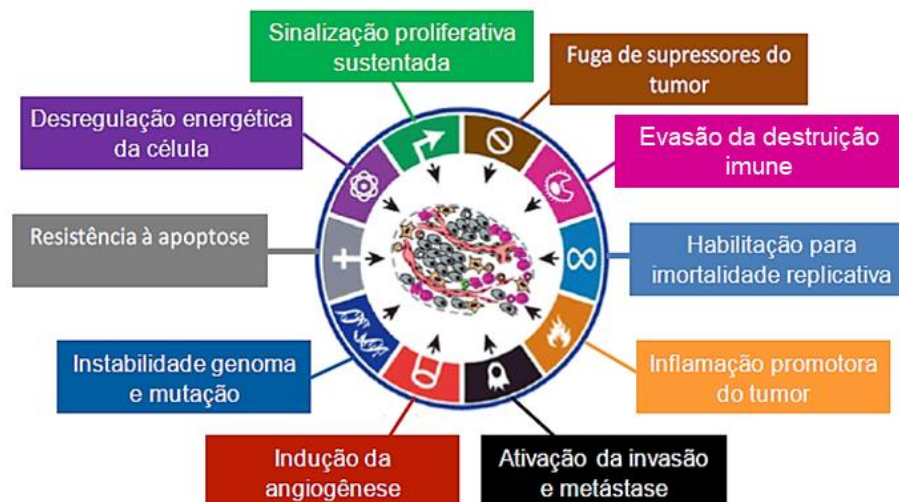


Fonte: Adaptado de LIU et al., 2015.

Legenda: A iniciação é o primeiro passo no desenvolvimento do câncer. A iniciação causa mudança genética permanente, qualquer célula filha proveniente da divisão da célula mutada também carregará a mutação. A promoção é a segunda etapa do processo carcinogênico. Os promotores referem-se aos compostos que promovem a proliferação da célula. A progressão é a terceira etapa e remete às transformações seriadas de um tumor benigno para a malignidade.

Por mais que os cânceres se diferenciem entre si, também existem propriedades compartilhadas por praticamente todos eles (MACHERET; HALAZONETIS, 2015). Para racionalizar e organizar a complexidade dessas características, Hanahan e Weinberg (2011), em uma revisão de literatura, classificaram os “*Hallmarks*” (marcas) do câncer, e estas incluem: i) sinalização

proliferativa sustentada – relacionada à autossuficiência do microambiente tumoral em criar e liberar fatores de crescimento para proliferação (NENCLARES; HARRINGTON, 2020); ii) fuga de sinais supressores de tumor – relacionada à perda de genes supressores de tumor ou ao acúmulo de mutações que tornam estes genes inativos (GUTSCHNER; DIEDERICHS, 2012); iii) evasão da destruição imune – caracterizada pelo escape das células tumorais do sistema imunológico (YARCHOAN et al., 2017); iv) imortalidade replicativa – a imortalização da célula tumoral por elevar a expressão e ativação da enzima telomerase (CLEAL; NORRIS; BAIRD, 2018); v) inflamação promotora do tumor – as células tumorais e células inflamatórias do estroma fornecem sinais ao microambiente do tumor favorecendo sua proliferação, sobrevivência e migração (SHALAPOUR; KARIN, 2015); vi) ativação de invasão e metástase – processos que induzem a perda da adesão célula-célula, invasão local e transporte das células por vasos sanguíneos até a chegada a um local metastático (NENCLARES; HARRINGTON, 2020); vii) indução de angiogênese – desequilíbrio entre fatores pró-angiogênicos e antiangiogênicos, favorecendo o surgimento de novos vasos (AL-ABD et al., 2017); viii) instabilidade do genoma e mutação – defeitos na maquinaria de manutenção do genoma promovem heterogeneidade genética em tumores, preservando genótipos favoráveis ao seu desenvolvimento (BAKHOUM; LANDAU, 2017; HERRERO et al., 2016); ix) resistência à apoptose – aumento na expressão de reguladores antiapoptóticos e de sinais de sobrevivência, diminuição da produção de fatores pró-apoptóticos e inibição de genes supressores de tumor (DAI et al., 2016; MORRIS; CHAN, 2015); e, por fim, x) reprogramação do metabolismo energético – metabolismo aberrante e a acelerada absorção da glicose permitindo a constante proliferação celular (BAGHDADI, 2017; BOSE; LE, 2018; HANAHAN; WEINBERG, 2011) (Figura 2).

Figura 2. Características biológicas do câncer

Fonte: Adaptado de HANAHAN; WEINBERG, 2011.

A transformação celular que leva ao acúmulo desse conjunto de características é orquestrada por duas classes de genes: os oncogenes e os genes supressores de tumores. Os oncogenes são derivados de versões mutadas de genes celulares normais, os proto-oncogenes. Nas células normais, a expressão de proto-oncogenes é regulada com muito cuidado para evitar o crescimento descontrolado das células, porém, no câncer, mutações nos proto-oncogenes causam divisão celular descontrolada, maior sobrevivência e disseminação do tumor (NENCLARES; HARRINGTON, 2020).

Existem muitas classes de oncogenes, a saber: i) receptores tirosinocinases – como o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) que regula o crescimento e a diferenciação celular; ii) tirosinocinases citoplasmáticas – por exemplo, o gene ABL que limita a proliferação, diferenciação, migração e sobrevivência celular; iii) serina/treonina cinases citoplasmáticas – como a RAF ou cinases dependentes de ciclina (CDKs) que regulam o controle do ciclo celular, proliferação, diferenciação, apoptose e sobrevivência; iv) GTPases ligadas à membrana – por exemplo, RAS que limita a proliferação celular; e v) fatores de transcrição – como o MYC que controla indiretamente a proliferação celular (PATTERSON et al., 2018; TEH; FEARON, 2020).

Já os genes supressores de tumores são genes celulares normais que funcionam para inibir a proliferação e a sobrevivência celular, contudo, no câncer,

ocorre a inibição desses genes para favorecer o crescimento do tumor. Exemplos desses genes incluem os genes que codificam a proteína p53 – a “guardiã do genoma” e principal alvo de mutação gênica – assim como a proteína retinoblastoma (Rb) e a p16 (BLOCH et al., 2016; KANG; ROSENWAKS, 2018; GIACINTI; GIORDANO, 2018) envolvidas na regulação do metabolismo celular (GOMES et al., 2018).

Então, a ativação de oncogenes e a redução ou supressão da atividade de genes supressores de tumor levam à transformação celular que envolve a desregulação de processos essenciais à célula, como proliferação e morte celular. Por isso, o entendimento das alterações que ocorrem na regulação do ciclo celular e na apoptose, a morte celular programada mais bem descrita, é essencial para a compreensão da biologia da doença, bem como para a busca por alvos farmacológicos no câncer.

2.2 Ciclo Celular

Uma célula se reproduz ao executar uma sequência organizada de eventos em que duplica seu conteúdo e, então, divide-se em duas. Esse ciclo de duplicação e divisão é o mecanismo essencial pelo qual todos os seres vivos se reproduzem (ROBERTSON et al., 2017).

O ciclo celular é um processo altamente ordenado que resulta em duplicação e transmissão de informações genéticas de uma geração de células para a próxima (TAN; DUNCAN; SLAWSON, 2017; ROBERTSON et al., 2017). O ciclo envolve a fase de síntese ou fase S, caracterizada pela ativação de complexos replicativos e duplicação do DNA; é seguido da fase M, onde ocorre a separação dos cromossomos pela citocinese, que é o processo pelo qual a célula divide o seu citoplasma gerando duas células-filhas independentes (SHERR; BARTEK, 2017; SIVIERO, 2013; MOURA 2017). Essas duas fases são intercaladas pelo intervalo G1 (entre fase M e fase S) e G2 (entre a fase S e a fase M) (ROACH et al., 2018).

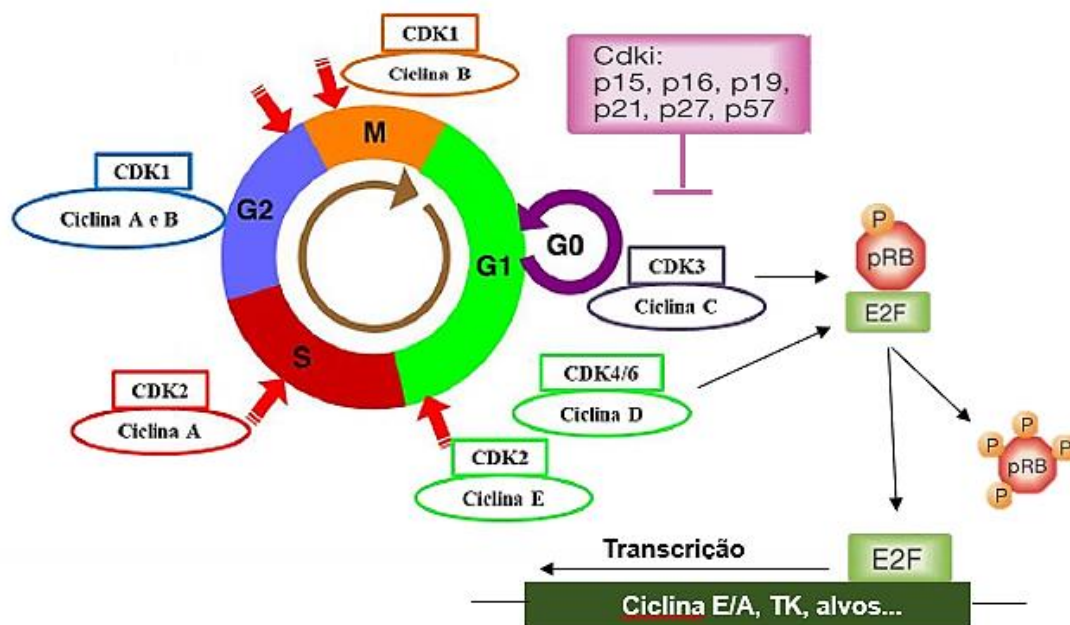
Durante a progressão do ciclo existem pontos de checagem (*checkpoints*), que estão localizados estrategicamente no final da fase G1 e na interface G2/M permitindo que as células entrem em mitose e diferenciem-se caso não haja danos no DNA, mas, se houver danos, os *checkpoints* são responsáveis por mantê-la no estágio

G0, que pode ser transitório (quiescente) ou permanente (senescência), ou ainda, conduzir a célula ao processo de apoptose, caso o dano seja irreversível (OTTO; SICINSKI, 2017; WEINBERG, 2013)

A célula normal depende de estímulos externos (mitógenos ou fatores de crescimento) para movê-la de G0 para G1. A célula responde a esses estímulos externos através de uma cascata de fosforilações intracelulares, regulando positivamente a expressão das ciclinas que se associam às cinases dependentes de ciclina (CDKs) (ISRAELS, 2001; ROBERTSON et al., 2017).

As CDKs – em associação física com suas subunidades catalíticas, as ciclinas – são serina/treonina quinases responsáveis por fosforilar as proteínas intracelulares que orquestram os eventos moleculares da progressão ordenada do ciclo celular (INGHAM; SCHWARTZ, 2017; ROACH et al., 2018; SHER, 2019) (Figura 3).

Figura 3. Fases e regulação do ciclo celular.



Fonte: Adaptado de ALEEM; ARCECI, 2015

Legenda: Setas em vermelho indicam os pontos de checagem. As vias de transduções ativadas por estímulos mitogênicos ativam o complexo ciclina D-CDK 4/6 no início da fase G1. A ativação desses complexos leva a fosforilação da pRb, liberando o fator de transcrição E2F, que se liga a sequências específicas de DNA promovendo grande variedade de genes que codificam proteínas necessárias à entrada na fase S. Complexos de CDK 2/ciclina A são ativados durante o ciclo celular para conduzir a transição da fase S para a fase G2, e, por fim, o complexo CDK1/Ciclina B guia a transição da fase G2

para a mitose. As atividades e funções dos complexos CDK/ciclina são reguladas pelos inibidores de CDKs (CDKIs), em condições normais ou extremas, como estresse, danos ao DNA e outros.

As CDKs clássicas que regulam diretamente o ciclo celular dos mamíferos em complexos com subunidades de ciclina incluem CDK3, CDK4, CDK6, CDK2 e CDK1. A CDK3 promove a entrada do ciclo celular a partir da quiescência em associação com a ciclina C (REN; ROLLINS, 2004; ROBERTSON et al., 2017).

Em seu modelo mais simples, o ciclo celular de eucarióticos procede da seguinte forma: No início de G1, CDK4/6 em complexo com ciclina D recebe sinais mitogênicos que resultam na ativação da entrada no ciclo celular. Os principais eventos de sinalização incluem: o início da fosforilação da pRb, principal regulador da progressão entre G1/S, seguido do sequestro de inibidores de CDKs (CDKIs), que caso ativados ligam-se a diversos alvos resultando em parada do ciclo celular (Figura 3) (AGUILAR; FAJAS, 2010; MALUMBRES, 2014; SHER, 2019).

No final da fase G1, CDK2/ciclina E completa a fosforilação e, portanto, a inativação da pRb, liberando o fator de transcrição E2F (KALDIS; ALEEM, 2005) que, por sua vez, promove a transcrição da ciclina E necessária para a transição G1/S (ALEEM; ARCECI, 2015).

A progressão na fase S é mediada pelo complexo CDK2/ciclina A. Então, os complexos CDK1/ciclina A contribuem para a preparação da mitose na fase G2 e, em seguida, a mitose é iniciada pelos complexos CDK1/ciclina B (SHER, 2019).

Além de seu papel direto na regulação do ciclo celular mitótico, alguns complexos CDK/ciclina têm funções essenciais na meiose, na transcrição e/ou reparo do DNA (por exemplo: CDK1, CDK2, CDK6) (SATYANARAYANA; KALDIS, 2009; NEGANOVA et al., 2011; WOHLBOLD et al., 2012; KOLLMANN et al., 2013; LIM; KALDIS, 2013; SCHEICHER et al., 2015).

O câncer está associado à mutações que interferem no fluxo das vias de sinalização ou, ainda, alterações nos genes formadores das proteínas do ciclo celular (OTTO; SICINSKI, 2017). Nesse contexto, alterações nos mecanismos de regulação do ciclo celular tornam a célula apta a passar pelo ciclo celular sem a devida checagem — por conta de sua capacidade de manter a sinalização proliferativa — permitindo o crescimento desordenado das células e o acúmulo de uma série de mutações que contribuem para o surgimento das características malignas do tumor

(ALEEM; ARCECI, 2015; OTTO; SICINSKI, 2017; HANAHAN; WEINBERG, 2011). Desse modo, as alterações em nível de ciclo celular representam marcas do câncer e são consideradas alvos potenciais para a ação de antineoplásicos, como por exemplo, antimetabólitos e alguns produtos naturais (ALMEIDA et al., 2005; FERREIRA et al., 2020).

Dentre as alterações no ciclo celular relacionadas à transformação neoplásica e à manutenção da alta capacidade proliferativa da célula, a ativação aberrante das CDKs — principalmente a via da CDK4/6 ciclina D, envolvida fase G1 — constitui um importante alvo para o desenvolvimento de novas alternativas para tratar o câncer (ALEEM; ARCECI, 2015; OTTO; SICINSKI, 2017).

O primeiro grupo de compostos inibidores específicos para o complexo CDK4/6 ciclina D é representado pelos fármacos palbociclib, ribociclib e abemaciclib, usados no tratamento de câncer de mama receptor hormonal positivo e HER2 negativo (receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano) (PETRELLI et al., 2019; POLK et al., 2016). Esses fármacos são administrados por via oral e tem como alvo a inibição da fosforilação da pRb, acarretando inibição da transcrição dependente de E2F e, conseqüentemente, uma parada sustentada no ciclo celular (SHAPIRO et al., 2013; BOSE et al., 2013).

O impacto dessa descoberta foi tão grande que em 2013 a *Food and Drug Administration* (FDA) designou o palbociclib como uma terapia inovadora (BROWER, 2014). Atualmente, existem diversos estudos clínicos em andamento com essas moléculas isoladas ou em combinação com outros fármacos para o tratamento de vários tipos de câncer, a citar neoplasias do ovário e mama, da cabeça e pescoço e melanomas (PETRELLI et al., 2019; EGGERSMANN et al., 2019; PORATTI; MARZARO, 2019).

2.3 Apoptose

A apoptose é um mecanismo de morte natural e altamente regulado desempenhado pelas células para manutenção da homeostase (D'ARCY, 2019). Em tecidos adultos que não estão crescendo, a morte e a divisão celular devem ser firmemente reguladas para assegurar que estejam em exato equilíbrio. No corpo

humano estima-se que aproximadamente 1×10^9 células sofram apoptose por dia (ELLIOTT; RAVICHANDRAN, 2010; ROBERTSON et al., 2017).

A apoptose é disparada por membros de uma família de proteases intracelulares especializadas em clivar sequências específicas de proteínas dentro da célula, as caspases, que são sintetizadas na célula como precursores inativos e são ativadas apenas durante a apoptose (ROBERTSON et al., 2017). Existem duas principais classes de caspases apoptóticas: as iniciadoras e as executoras (PFEFFER; SINGH, 2018).

As caspases iniciadoras (caspases 8 e 9), a partir de um sinal apoptótico, iniciam a cascata proteolítica ativando as caspases executoras (caspase-3, -6 e -7) que executarão uma série de eventos para fragmentar o DNA, ativar endonucleases, destruir proteínas nucleares e o citoesqueleto, expressar ligantes para células fagocíticas e, por fim, formar os corpos apoptóticos (CARNEIRO; EL-DAIRY, 2020; MARTINVALET et al., 2005; POON et al., 2014)

A via apoptótica pode ser ativada por sinais intra ou extracelulares (PFEFFER; SINGH, 2018). Os sinais intracelulares incluem dano ao DNA e privação de fatores de crescimento e citocinas, enquanto os extracelulares mais comuns são os sinais indutores de morte produzidos por células T citotóxicas do sistema imune em resposta às células danificadas ou infectadas (ZAMAN et al., 2014). A depender do sinal recebido a via extrínseca (sinais extracelulares) e a intrínseca (sinais intracelulares) podem se correlacionar (PFEFFER; SINGH, 2018).

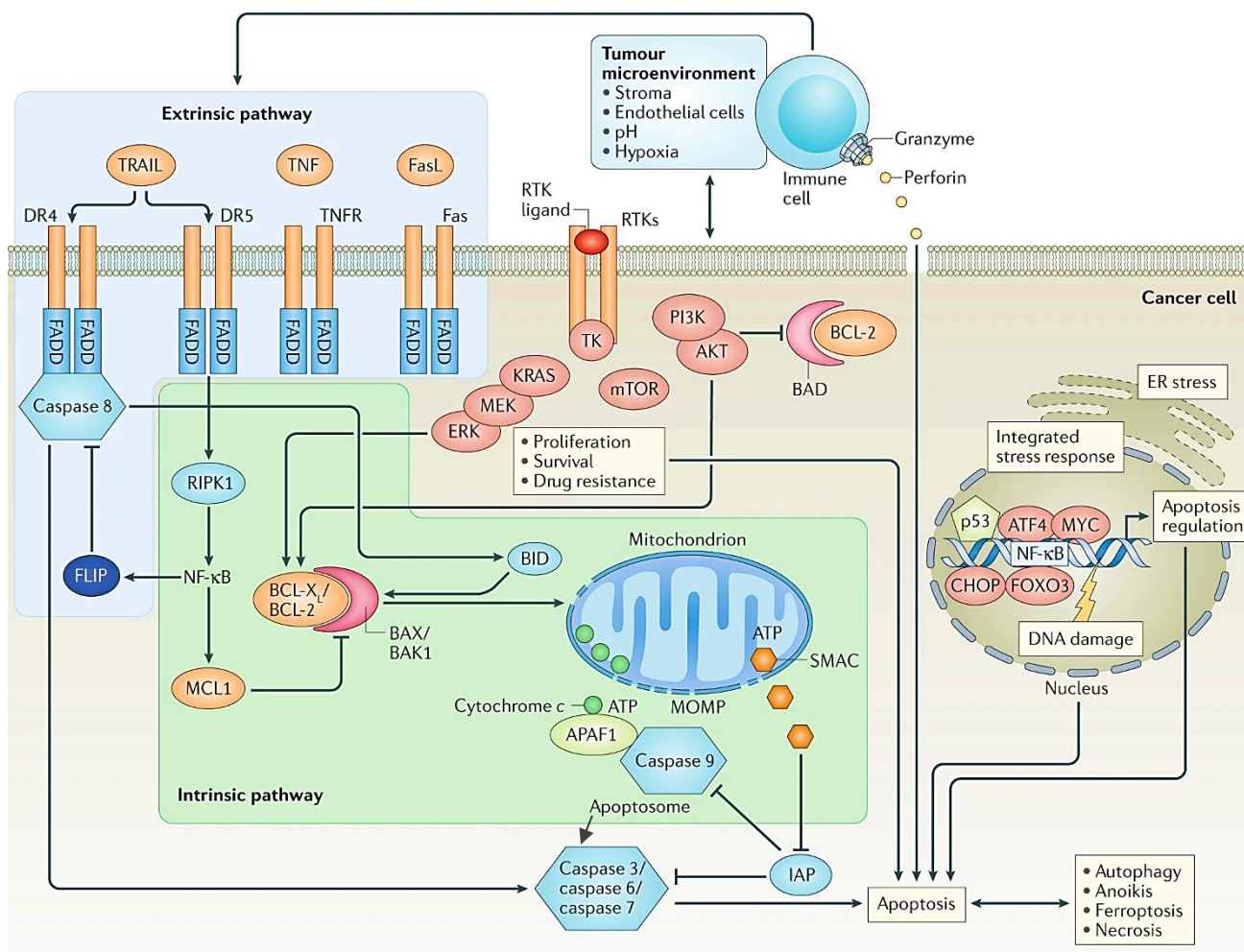
A via extrínseca é iniciada por proteínas da membrana celular conhecidas como receptores de morte, a citar o Fas (cujo ligante fisiológico é FasL), o receptor do fator de necrose tumoral (TNFR) (cujo ligante é o TNF), e o ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (TRAIL) (D'ARCY, 2019; JIN; EL-DEIRY, 2005). Após ativação, os receptores de morte trimerizam e recrutam proteínas adaptadoras, como FADD e caspases iniciadoras para formar o complexo de sinalização indutor de morte (DISC) (KIM et al., 2004). Na via extrínseca, a ativação das caspases iniciadoras é regulada negativamente pelo FLIP (regulador de apoptose do tipo FADD), todavia, uma vez ativada as caspases iniciadoras, ocorrerá a ativação de pró-caspases executoras, principalmente caspases-3 e -7, culminando na rápida morte celular (Figura 4) (MUKHOPADHYAY et al., 2014; PISTRITTO et al., 2016). A ativação das caspases

iniciadoras 8 e 10 também leva à clivagem do BID, um membro pró-apoptótico da família Bcl-2, que será translocado para as mitocôndrias contribuindo para a liberação do citocromo c amplificando a apoptose (BILLEN et al., 2008; CARNEIRO; EL-DAIRY, 2020) (Figura 4).

Na via intrínseca os principais mediadores são a permeabilização da membrana externa mitocondrial (MOMP) e a liberação subsequente do citocromo c para o citoplasma, estimuladas por membros pró-apoptóticos da Família Bcl-2 (como BAX, BAK1, BIM, BID e PUMA) e inibido por membros antiapoptóticos da mesma família (como Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Bcl-2-A1 e MCL1) (NIJHAWAN et al., 2003; KALKAVAN; GREEN, 2017). Quando presente no citoplasma da célula, o citocromo c liga-se à proteína adaptadora de ativação da pró-caspase, o APAF1 (fator de ativação de protease associada à apoptose 1), iniciando a formação do apoptossomo, um complexo proteico responsável pelo recrutamento e ativação da pró-caspase-9. Quando ativa, a caspase-9 promove a ativação das caspases efetoras (-3 e -7), desencadeando a morte celular (Figura 4) (HINZ; LAGARES, 2019; TAN et al., 2018).

A ativação das caspases efetoras pode ser regulada negativamente por proteínas IAP (Inibidores de Proteínas da Apoptose ligadas ao cromossomo X) (CHESI et al., 2016). Algumas proteínas liberadas da mitocôndria juntamente com o citocromo c (por exemplo, SMAC e HTRA2) bloqueiam funcionalmente as IAP, facilitando a atividade das caspases e a morte celular (VAN LOO et al., 2002).

Figura 4 - Visão geral das vias de sinalização da apoptose e os efeitos da sinalização pró-sobrevivência, células imunes e microambiente tumoral.



Fonte: CARNEIRO; EL-DAIRY, 2020

Legenda: A via extrínseca é ativada quando ligantes ativam receptores de morte, recrutando FADD e caspase 8 e/ou 10 para formar o complexo de sinalização indutor de morte (DISC) promovendo ativação de caspases efetoras e a apoptose. Já na via intrínseca a atividade das proteínas pró-apoptóticas Bcl-2 aumenta a permeabilidade da membrana externa mitocondrial liberando o citocromo c, que ativa as caspases e causa apoptose. O apoptossomo multimérico é formado quando o citocromo c liga-se à APAF1 em um processo dependente de ATP. A caspase 9 se liga ao apoptossomo e ativa a caspase 3. Membros da família IAP (Inibidores de Proteínas da Apoptose ligadas ao cromossomo X) regulam negativamente a ativação da caspase e podem ser inativados pelo SMAC. As proteínas Bcl-2 antiapoptóticas inibem as proteínas Bcl-2 pró-apoptóticas. Em algumas células, a clivagem de BID leva à liberação do citocromo c por mitocôndrias e apoptose. O FLIP se liga à caspase 8 e impede sua ativação. As vias de sinalização dos receptores tirosina cinases (RTKs) promovem a proliferação celular e regulam negativamente a via intrínseca, através da inibição das proteínas pró-apoptóticas. As células imunes produzem granzimas e perforinas que forma poros nas células-alvo para mediar a morte. Outros componentes do microambiente tumoral podem influenciar nas vias de morte e sobrevivência celular.

Estudos recentes sobre a biologia do câncer mostraram que a apoptose e os genes que a controlam têm uma influência significativa nos processos de carcinogênese. Além disso, a desregulação das vias de apoptose contribui para a geração de resistência às terapias anticâncer utilizadas atualmente, visto que muitas proteínas antiapoptóticas — como as proteínas Bcl-2, Bcl-XL, MCL1 ou IAP — estão superexpressas em tumores humanos (KALKAVAN; GREEN, 2018; NAGATA; TANAKA, 2017).

Em geral os fármacos antineoplásicos regulam a apoptose principalmente pela via intrínseca, produzindo danos ao DNA e inibição de determinados alvos críticos deste processo, tais como as proteínas antiapoptóticas da família Bcl-2 (CARNEIRO; EL-DEIRY, 2020; GOLDAR et al., 2015; KACZANOWSKI, 2016).

Diferentes ensaios clínicos com agentes terapêuticos projetados para inibir membros antiapoptóticos da família Bcl2 estão em desenvolvimento para tratar tumores sólidos e não sólidos (CARNEIRO; EL-DAIRY, 2020). Dentre essas moléculas conhecidas como inibidores de Bcl-2 destaca-se o venetoclax, aprovado em 2019 como o tratamento de primeira linha para leucemia linfocítica crônica (ROBERTS et al., 2016; ISCHER et al., 2019).

2.4 Estresse oxidativo no câncer

O estresse oxidativo refere-se ao desequilíbrio entre a geração de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio (ROS/RNS) e a capacidade das células de neutralizá-las pela defesa antioxidante (PERSSON et al., 2014; PING et al., 2020).

As espécies reativas de oxigênio (ROS) englobam os radicais de oxigênio, como o ânion superóxido (O_2^-), os radicais hidroxila ($OH^\cdot$), peroxila ($RO_2^\cdot$), assim como espécies não radicais, que podem funcionar como agentes oxidantes, a citar o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ácido hipocloroso ($HOCl$), o ozônio (O_3) e o oxigênio singlete ($^1O_2$) (LIU et al., 2020; TALEB 2018). Já as RNS englobam o óxido nítrico ($NO^\cdot$) e o peroxinitrito ($ONOO^\cdot$) (KUPSCO; SCHLENK, 2015).

Essas pequenas moléculas oxidantes contêm elétrons não emparelhados, instáveis e são altamente reativos para proteínas, lipídios, carboidratos e ácidos nucleicos, e surgem de várias fontes celulares (BHATTACHARYYA et al., 2014).

ROS são produzidas em vários compartimentos subcelulares por reações enzimáticas ou não enzimáticas (LIGUORI et al., 2018). Os mecanismos enzimáticos são diversos e incluem NADPH oxidases, óxido nítrico sintases, xantina oxidase, enzimas do citocromo P450, ciclo-oxigenases e lipoxigenases. Mecanismos não enzimáticos incluem a redução de oxigênio para a produção de superóxido na mitocôndria (GORRINI et al., 2013; LIU et al., 2020).

A maioria dessas enzimas atuam na mitocôndria, contudo o retículo endoplasmático também serve como fonte de ROS durante o dobramento de proteínas, reações de oxirredução e outros mecanismos (BHANDARY et al., 2012; HIGA; CHEVET, 2012). Os peroxissomos produzem ROS por meio da oxidação β dos ácidos graxos e da atividade da flavina oxidase (GIL et al., 2017; PING et al., 2020).

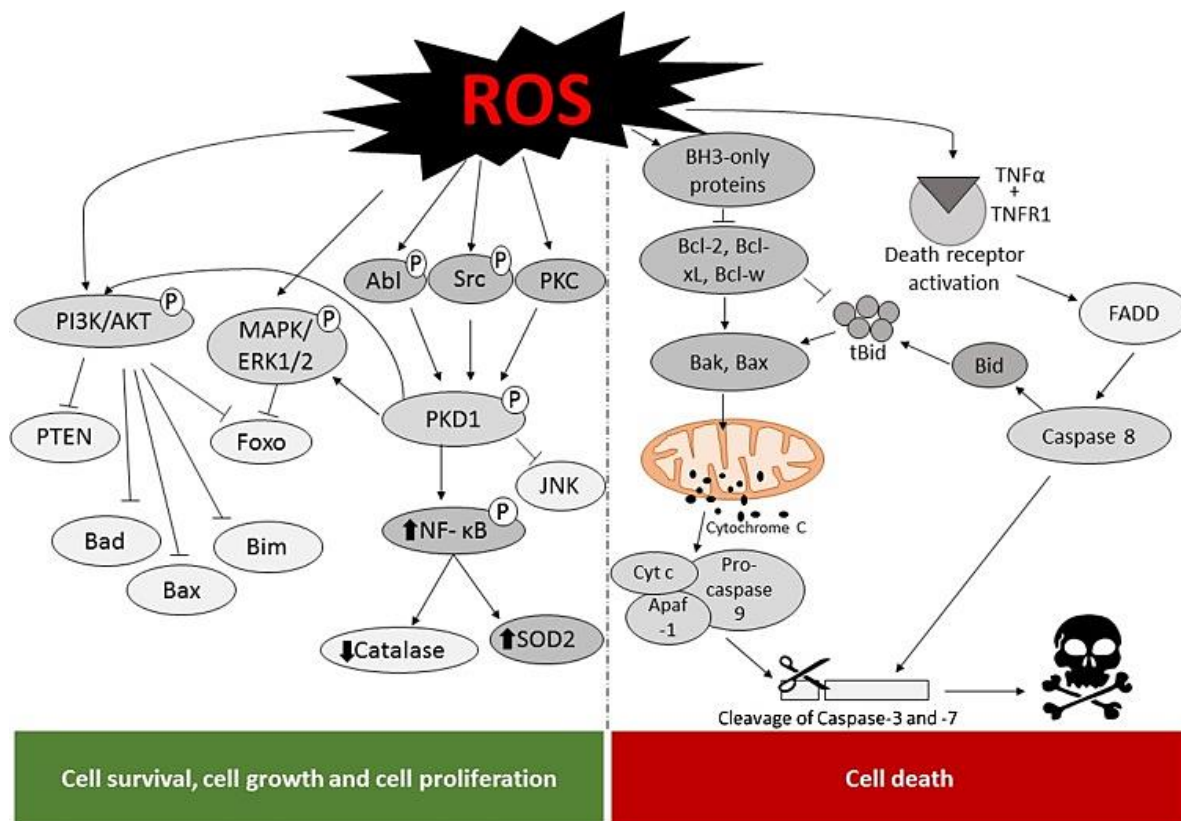
Além da produção endógena, os níveis celulares de ROS aumentam a partir de fontes exógenas, a citar a exposição à radiação UV, às toxinas, aos metais pesados, à quimioterapia e até mesmo a presença de células inflamatórias vizinhas (AZZAM et al., 2012; VERA-RAMIREZ et al., 2012; BHATTACHARYYA et al., 2014).

Para que as células mantenham a homeostase existem mecanismos antioxidantes que protegem as biomoléculas vitais das ROS. As enzimas antioxidantes incluem superóxido dismutases (SODs), catalase (CAT), peroxirredoxinas (PRDXs), tioredoxinas (TRXs), glutathione peroxidase (GPx), heme oxigenase-1 (HO-1), e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) que trabalham juntas para neutralizar ROS nas células (SABHARWAL; SCHUMACKER, 2014; LIU et al., 2020). Os antioxidantes não enzimáticos incluem proteínas e metabólitos produzidos pelas células (glutathione - GSH, bilirrubina, melatonina, ácido úrico), assim como componentes da dieta a citar as vitaminas A, C e E, o selênio e o β -caroteno (TAMARI et al., 2013; GIUSTARINI et al., 2017; GIL et al., 2016).

ROS de fontes endógenas e exógenas, se não forem desintoxicadas por antioxidantes, podem induzir um aumento no estresse oxidativo na célula o que pode acarretar em danos a proteínas, lipídeos e DNA (KLAUNING, 2017; LIGUORI et al., 2018). A mutação do DNA é um componente essencial no processo de carcinogênese, e ROS estão associadas ao câncer há muito tempo, desde quando foi observado que células tumorais produzem níveis elevados de ROS quando comparadas com células normais (PANIERI; SANTORO, 2016; MOLONEY; COTTER, 2018).

No entanto, a regulação de ROS nas células tumorais deve ser rigorosamente regulada para evitar a morte das mesmas (MOLONEY; COTTER, 2018). Nesse sentido, a produção de ROS tem papel dual nas células cancerígenas. Um aumento nos níveis de ROS no câncer implica na proliferação, sobrevivência, aumento do crescimento celular e no desenvolvimento do tumor através da regulação da proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK), proteína cinase regulada por sinal extracelular 1/2 (ERK1/2), da fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K)/Akt, da proteína cinase D (PKD), proteína tirosina fosfatase 1B (PTP1B), da via do fator nuclear κ B (NF κ B), bem como por mutações em fatores de transcrição e genes supressores de tumor, incluindo Nrf2 e p53 (LIOU; STORZ 2010; RECZEK; CHANDEL, 2018; MOLONEY; COTTER, 2018) (Figura 5).

Por outro lado, níveis tóxicos de ROS nas células induzem parada do ciclo celular, apoptose e senescência (MOON et al., 2010) (Figura 5). A ativação da via JNK pela produção tóxica de ROS pode resultar em apoptose pela via intrínseca ou extrínseca (CHAISSWING; CLAIR, 2018). Inativações das vias JNK foram observadas em vários tipos de câncer, sugerindo que essas vias podem estar implicadas na sinalização apoptótica (RECZEK; CHANDEL, 2018). Sendo assim, é possível alcançar uma superprodução de ROS com quimioterapia, com aumento de produção pelas células imunes ou pela depleção de proteínas antioxidantes nas células (GROEGER et al., 2009; MOLONEY; COTTER, 2018).

Figura 5 - Sinalização induzida por ROS em células cancerígenas.

Fonte: Adaptado de MOLONEY; COTTER, 2018

Legenda: A produção de ROS tem papel dual nas células cancerígenas. Os níveis aumentados de ROS contribuem para a sobrevivência e proliferação celular sustentadas por muitas vias, incluindo PI3K/AKT, MAPK/ERK1/2 e PKD e por inativação de proteínas pró- apoptóticas (Bad, Bax, Bim, Foxo e PTEN). No entanto, os níveis tóxicos de ROS na célula causa morte celular por apoptose intrínseca (iniciada nas mitocôndrias) ou extrínsecas (via receptores de morte). Os níveis tóxicos de ROS causam danos à membrana mitocondrial, resultando na liberação e translocação do citocromo C para o citoplasma, que forma um complexo com Apaf-1 e pró-caspase 9 induzindo a clivagem da caspase-3 e 7, resultando em apoptose. O ligante TNF junto com o receptor de morte TNFR1 desencadeia a ativação da caspase 8 iniciadora, resultando na clivagem da caspase 3 e da proteína Bid ativando a via intrínseca.

Por esse motivo, as terapias que elevem ou reduzam a produção de ROS podem ser potencialmente eficazes contra o câncer, embora seja um conceito bastante desafiador. Atualmente, diversos quimioterápicos utilizados na clínica agem na modulação de ROS, a citar doxorrubicina, mitomicina C, mitoxantrona, carmofur, gencitabina, mercaptopurina, camptotecina, paclitaxel, vimblastina e vinorelbina

(ZHANG et al., 2012; YOKOYAMA et al., 2017). Entretanto é importante ressaltar que os resultados dependerão de vários fatores, como por exemplo, do tipo de célula acometida, dos tipos de ROS envolvidas (O_2^- , H_2O_2 etc.) e da duração da exposição à ROS (KLAUNING, 2017).

2.5 Farmacoterapia do câncer

A partir do entendimento dos eventos que transformam uma célula saudável em uma célula cancerosa, novas terapias são desenvolvidas para tratar um gene crítico ou uma via biológica (CALDERON et al., 2014; MANGUEIRA, 2019). Dessa forma, o tratamento contra o câncer está em crescente evolução, na tentativa de minimizar os números de mortes devido à essa doença (AMARAL, 2018; FERLAY et al., 2015).

Atualmente as modalidades de tratamento do câncer são cirurgia, radioterapia, transplante de medula óssea, terapia alvo, terapia hormonal, imunoterapia e a quimioterapia – modalidade mais empregada (MILLER et al., 2019).

A cirurgia consiste na retirada do tumor através de operações no corpo do indivíduo visando à remoção total do tumor. O ato cirúrgico pode ter finalidade curativa, quando há detecção precoce do tumor e é possível sua retirada total; ou finalidade paliativa, quando o objetivo é de reduzir a quantidade de células tumorais ou de controlar sintomas que comprometam a qualidade da sobrevivência do indivíduo acometido com a doença (INCA, 2020).

A radioterapia, sozinha ou em combinação, é usada em mais de 50% dos casos para tratar indivíduos com diversos tipos de câncer e consiste na utilização de fótons de alta energia que se depositam no tecido tumoral, destruindo-o (ALLEN, 2017). A sua eficácia é interpretada como consequência de um melhor controle local do tumor, redução da disseminação da doença, e menos efeitos colaterais podendo ser considerada como a terapia citotóxica mais eficaz disponível para o tratamento de indivíduos com tumores sólidos (FALCKE et al., 2018; JAROSZ-BIEJ et al., 2019).

A terapia alvo refere-se ao uso de substâncias direcionadas a algumas moléculas específicas (alvos moleculares) para bloquear o crescimento e a disseminação de células cancerígenas (LEE; TAN; OON, 2018). Esses agentes

conseguem discriminar pequenas diferenças entre células saudáveis e tumorais, proporcionando terapias mais eficazes do que em outros tratamentos convencionais e com menores efeitos adversos indesejáveis (BAHRAMI et al., 2017). As principais classes são as moléculas inibidoras de tirosinocinase (TKIs) e os anticorpos monoclonais (mAb) (FRERES; JERUSALEM; MOONEN, 2017).

A hormonioterapia é utilizada para diversos tumores, exemplos são os cânceres de mama, útero, ovário e próstata (CROMBIE; LONGO, 2016). Essa terapia é usada por indivíduos que expressam receptores para estrogênios (ER+) e/ou progesterona (PR+) em tumores dependentes desses hormônios. Desse modo, esta terapia objetiva impedir a interação entre estrogênios e seus receptores, por meio do uso de antagonistas (a citar o tamoxifeno, toremifeno, raloxifeno) reduzindo a proliferação tumoral (DRĂGĂNESCU; CARMOCAN, 2019).

A imunoterapia em oncologia abrange vários meios de utilizar o sistema imunológico do indivíduo para combater a malignidade, superando a capacidade do tumor de escapar do sistema imune para que a intensidade das respostas aumente (DAWE; HARLOS; JUERGENS, 2020). Entre as imunoterapias disponíveis, destacam-se os inibidores do ponto de verificação imune (ICIs), terapias celulares, incluindo terapia com células T do receptor de antígeno quimérico (CAR), vacinas e vírus oncolíticos (RAHMAN et al., 2020).

A quimioterapia continua sendo o principal método para o tratamento do câncer (BUKOWSKI; KCIUKE; KONTEK, 2020). A depender de sua origem, os quimioterápicos podem ser divididos em agentes derivados de plantas (KIKUCHI et al., 2019) ou de origem sintética (PENG et al., 2020). Dependendo do mecanismo de ação, eles podem ser divididos em agentes alquilantes, antimetabólitos e produtos naturais (inibidores da topoisomerase, inibidores do fuso mitótico) (BUKOWSKI; KCIUKE; KONTEK, 2020).

Os agentes alquilantes recebem esse nome pois criam ligações cruzadas inter ou intra-cadeia e transferem grupos alquil para os resíduos de guanina do DNA, prejudicando processos essenciais como a replicação e a transcrição (AMARAL., 2018; LE et al., 2017; NUSSBAUMER et al., 2011). Exemplos desta classe são as oxazafosforinas (ciclofosfamida e ifosfamida); as mostardas nitrogenadas (bussulfano, clorambucil e melfalano); a hidrazina (temozolomida); os agentes a base

de platina (cisplatina, carboplatina e oxaliplatina) (LE; SHIVARAM; KLEIN, 2007); e os novos, ainda sob investigação, agentes alquilantes do tipo *OFF-ON*, como vinil-quinazolinona (VQ) (INFANTE et al., 2018).

Os antimetabólitos interferem nas vias biossintéticas essenciais e perturbam a síntese de DNA/RNA por meio da inibição de enzimas específicas pela incorporação de falsos análogos estruturais da pirimidina/purina no DNA. Esta classe pode ser dividida em vários grupos: antagonistas da pirimidina (citarabina, 5-fluorouracil (5-FU) e gencitabina); antagonistas da purina (fludarabina); análogos da purina (azatioprina e cladribina); antifolatos (metotrexato, pemetrexedo e pralatrexato); e inibidores da ribonucleotídeo redutase (hidroxiureia) (LE et al., 2017; MARCHI; O'CONNOR, 2012; NUSSBAUMER et al., 2011).

Os produtos naturais, ou derivados destes, que atuam inibindo a topoisomerase I (irinotecano e topotecano) ou a topoisomerase II (etoposídeo, teniposídeo e antraciclinas, por exemplo a doxorrubicina) bloqueiam as atividades das topoisomerasas envolvidas na replicação do DNA e causam quebras na cadeia do DNA (BAX et al., 2019; INFANTE et al., 2018). Os inibidores do fuso mitótico, como taxanos (docetaxel e paclitaxel) e alcaloides da vinca (vincristina e vinblastina) modificam a função/formação dos microtúbulos do fuso pela inibição da divisão nuclear (parada mitótica na metáfase), levando à morte celular (LE et al., 2017; NUSSBAUMER et al., 2011; BUKOWSKI; KCIUKE; KONTEK, 2020).

Outros agentes quimioterapêuticos, incluindo algumas enzimas (L-asparaginase), inibidores de proteassoma (bortezomibe) e antibióticos (bleomicina, actinomicina D e antraciclinas) são caracterizados por mecanismos de ação não homogêneos (BUKOWSKI; KCIUKE; KONTEK, 2020).

A quimioterapia sistêmica tradicional envolve a ampla distribuição de moléculas de droga no organismo, causando efeitos colaterais tóxicos nos tecidos saudáveis, especialmente os de rápido crescimento (ESKANDARI et al., 2020). Isso ocorre devido a não distinção entre as células saudáveis das neoplásicas pelos quimioterápicos, acarretando efeitos colaterais indesejáveis como alopecia, náuseas e vômitos intensos, mielossupressão, anemia, linfomas e leucemias, refletindo o alto nível de toxicidade associado a tais tratamentos (ANSARIZADEH; SINGH; RICHARDS, 2017; FEITELSON et al., 2015; SHARMA et al., 2015).

Além dos graves efeitos tóxicos, o desenvolvimento de quimiorresistência por parte dos tumores pode surgir com a quimioterapia convencional (COLETTI, 2018). Esse fenômeno clínico pode ocorrer através de vários mecanismos como a diminuição da absorção, diminuição da ativação ou aumento do efluxo do fármaco, alteração da proteína alvo, aumento do reparo do DNA, inibição da apoptose e aumento do metabolismo do fármaco (FERNANDO; JONES, 2015; BUKOWSKI; KCIUKE; KONTEK, 2020).

Dessa forma, o desenvolvimento de agentes quimioterápicos mais seguros e eficientes é uma das principais prioridades e desafios no tratamento do câncer. Nesse cenário, se insere a pesquisa de produtos naturais com atividade antitumoral, considerando a significativa contribuição dos produtos naturais para o desenvolvimento de muitos medicamentos usados na quimioterapia atual.

2.6 *Lippia microphylla*: Família, gênero e espécies

A família Verbenaceae inclui 2.600 espécies agrupadas em 100 gêneros com distribuição pantropical. O número mais significativo de espécies é encontrado na América Latina. Esta família envolve ervas, arbustos e algumas árvores, que são um elemento importante na flora da América do Sul (O'LEARY et al., 2012; ZAMORA; TORRES, NUNEZ, 2018). As plantas desta família são conhecidas por serem espécies aromáticas, utilizadas para uso ornamental ou na medicina popular como agentes digestivo, carminativo, antipirético, antitussígeno, antisséptico e curativo (ZAMORA; TORRES, NUNEZ, 2018).

O gênero *Lippia* inclui cerca de 200 espécies de ervas, arbustos e pequenas árvores distribuídas principalmente nas Américas Central e do Sul e na África Tropical (SANTOS et al., 2009; AGRA et al., 2007). Algumas espécies de *Lippia* são prevalentes no bioma da Caatinga, região com aproximadamente 1.539.000 km, distribuída em nove estados do Nordeste brasileiro, com clima quente e seco, onde cresce uma peculiar vegetação xerófita (SIMÕES et al., 2015)

Esse gênero é utilizado popularmente como remédio para o tratamento de doenças, bem como na produção de alimentos (SAMBA, 2021). A maioria das espécies de *Lippia* possuem propriedades medicinais, a citar *L. alba*, espécie mais

encontrada no Brasil, possui propriedades antifúngicas, antibacterianas (JULIÃO et al., 2020), antioxidantes (PEIXOTO et al., 2015) e tripanocida (MORENO et al., 2018); *L. multiflora* possui atividade antimicrobiana, analgésica, antipirética e anti-inflamatória (SAMBA et al., 2021; SORO et al., 2016; ABENA et al., 2003). Já *L. siddoides* apresenta atividade antimicrobiana tão evidente que se encontra incluída no programa de fitoterapia do Ministério da Saúde do Brasil (ALMEIDA et al., 2018); *L. integrifolia* e *L. junelliana* são potentes repelentes (GLEISER et al., 2011).

Adicionalmente, compostos isolados de espécies desse gênero revelaram atividade antitumoral *in vitro* em linhagens celulares de leucemia (K-562, HL-60, CEM), de carcinoma de cólon (HCT-116), câncer de mama (MCF-7), glioblastoma (U-251) e câncer de próstata (PC -3) (COSTA et al., 2001; GONZÁLEZ-GUËRECA et al., 2010)

A espécie *L. microphylla* Cham., popularmente chamada de “alecrim-da-chapada”, “alecrim-de-tabuleiro”, “alecrim-pimenta” e “alecrim-do-mato” no Nordeste brasileiro, é um arbusto decíduo com caule fino e quebradiço (até 2 m de altura), flores brancas e com folhas simples e aromáticas, que apresentam margens serrilhadas e nervos evidentes com comprimento não superior a 1 cm (Figura 6) (SILVA et al., 2021; SIMÕES et al., 2018).

Registros etnofarmacológicos relatam o uso das folhas de *L. microphylla* no tratamento de distúrbios gastrointestinais, influenza, bronquite e sinusite durante a vaporização resultante da fervura da água (AGRA et al., 2008). Estudos fitoquímicos revelaram a presença de quinonas e flavonoides em extratos etanólicos do caule e raízes (SANTOS et al., 2003; SANTOS et al., 2002). Entre os produtos vegetais obtidos de *L. microphylla* destacam-se os óleos essenciais, que são responsáveis por diversas propriedades físicas, químicas e biológicas da família como um todo (ALMEIDA et al., 2018).

Os óleos voláteis, também chamados de óleos essenciais, óleos etéreos ou essências, são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, em geral odoríferas e líquidas, obtidas de matérias-primas vegetais (SIMÕES, 2017). Na família Verbenaceae, o gênero *Lippia* produz grandes quantidades de misturas voláteis. Estudos químicos por técnicas de cromatografia gasosa de constituintes voláteis das folhas de *L. microphylla* demonstraram que seus principais constituintes

são o timol (46,52%), seu isômero carvacrol (31,74%) e *p*-cimeno (9,0%) (XAVIER, 2015). Contudo é importante destacar que composição química dos óleos essenciais pode variar muito devido a fatores fisiológicos (órgão da planta), ambientais (composição do solo, condições climáticas), genéticos e condições de armazenamento de materiais vegetais (SANLI et al., 2017; SHARMEEN et al., 2021)

Os óleos essenciais podem ser úteis na prevenção e no tratamento do câncer através de efeitos antioxidantes, antimutagênicos, antiproliferativos, e ainda induzindo enzimas para desintoxicação aprimorada e modulando a resistência a múltiplas drogas (GOMES et al., 2016). Uma revisão da atividade anticâncer de óleos essenciais concluiu que a teoria da ação sinérgica parece ser significativa e, portanto, para fins biológicos, é mais importante estudar todo o óleo essencial do que seus componentes separadamente (BHALLA et al. 2013).

Figura 6 – *Lippia microphylla* Cham. (Verbenaceae).



Fonte: TAVARES, 2007.

Legenda: Imagem das partes aéreas de *L. microphylla*, um arbusto muito ramificado e quebradiço medindo cerca de 2-3 m de altura

Em relação às atividades biológicas do óleo essencial das folhas de *L. microphylla* pode-se destacar atividades larvicida em larvas de *A.*

aegypti (SANTIAGO et al., 2006), antioxidante (DAVID et al., 2007), antifúngica e antimicrobiana (SOUZA et al., 2005; RODRIGUES et al., 2011; SCHURT et al., 2012).

A extração e caracterização do óleo essencial extraído das folhas de *L. microphylla* foi realizada pela equipe de Fitoquímica do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB/CCS/UFPB) e foi descrita por Xavier et al. (2015) (Tabela 1).

Em adição, trabalhos realizados pela equipe de pesquisa do Laboratório de Oncofarmacologia (ONCOFAR/PPgPNSB/CCS/UFPB) mostram que o óleo essencial das folhas de *L. microphylla* possui atividade antitumoral *in vitro* nas linhagens (K562 – leucemia humana) e Sarcoma 180 (sarcoma murino), com valores de concentração que produz 50% de inibição do crescimento celular (CI_{50}) de 60,05 µg/mL e 100,1 µg/mL, respectivamente. Esse trabalho também descreve a atividade antitumoral *in vivo* do referido óleo em modelo de sarcoma 180 (XAVIER, 2011; XAVIER et al., 2015). Considerando esses dados que vislumbram o potencial antitumoral do óleo essencial das folhas de *L. microphylla*, o presente trabalho avaliou sua atividade antitumoral *in vitro* em seis linhagens de células tumorais humanas, bem como possíveis mecanismos de ação envolvidos nesse efeito.

Tabela 1 - Constituintes químicos presentes no óleo essencial das folhas de *Lippia microphylla* Cham. (Verbenaceae) obtidos por cromatografia gasosa acoplado à espectrometria de massas (CG-EM).

IR*	Constituintes	(%)
929	α -pineno	0,51
988	mirreno	1,40
1014	α -terpineno	0,20
1023	<i>p</i> -cimeno	9,00
1055	γ -terpineno	2,92
1088	<i>p</i> -cimeneno	0,10
1097	hidrato de trans-sabineno	0,10
1128	aloocimeno	0,10
1133	<i>cis</i> -p-menta-2,8-dien-1-ol	0,10
1170	umbelona	0,12
1179	4-terpineol	0,57
1182	<i>p</i> -cimen-8-ol	0,10
1186	α -terpineol	0,10
1227	metiltimol	0,28
1236	metilcarvacrol	0,20
1293	timol	46,52
1301	carvacrol	31,74
1343	acetato de carvacrol	1,61
1362	acetato de timol	1,32
1415	β -cariofileno	1,15
1430	<i>trans</i> - α -bergamoteno	0,11
1451	α -humuleno	0,06
1476	hidroxianisol butilado	0,68
1505	β -bisaboleno	0,42
1537	espatulenol	0,16
1576	óxido de cariofileno	0,42
Total		99,99

IR* = índice de retenção

Fonte: XAVIER et al., 2015

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- ✓ Investigar a atividade antitumoral do óleo essencial das folhas de *Lippia microphylla* (OE-LM) (Verbenaceae), por meio de ensaios *in vitro*.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a atividade antitumoral *in vitro* do OE-LM em linhagens de células tumorais humanas (HCT-116, HeLa, SK-MEL-28, MCF-7, MDA-MB-231, PC-3);
- ✓ Avaliar a citotoxicidade do OE-LM em linhagem de célula não tumoral humana (HaCaT);
- ✓ Determinar o índice de seletividade (IS) do óleo essencial para as diferentes linhagens tumorais e selecionar a linhagem para a qual o OE-LM mostrou maior IS, para a continuação dos estudos;
- ✓ Investigar a interferência do OE-LM no ciclo celular;
- ✓ Estudar o tipo de morte celular induzido pelo OE-LM (apoptose ou necrose);
- ✓ Avaliar o efeito do OE-LM na modulação do estado redox celular.

Material e métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local da pesquisa

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Oncofarmacologia (ONCOFAR), localizado no Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM), onde funciona o Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB) do Centro de Ciências da Saúde (CCS/UFPB) na Universidade Federal da Paraíba.

4.2 MATERIAL

4.2.1 Material botânico

A espécie *Lippia microphylla* Cham. foi coletada em 2018 no município de Serra Branca, estado da Paraíba, nas coordenadas: Latitude: 7° 29' 14" Sul, Longitude: 36° 39' 51" Oeste. O material botânico foi identificado pela Profa. Dra. Maria de Fátima Agra, do setor de Botânica do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB), do Centro de Ciências da Saúde (CCS), da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Uma exsicata da planta está depositada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB), da UFPB sob código de identificação AGRA 6118. O estudo encontra-se cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) sob certidão nº A60AE36.

4.2.2 Produto teste

O óleo essencial obtido das folhas de *Lippia microphylla* Cham. (OE-LM) foi gentilmente cedido pelos Profs. Drs. Josean Fechine Tavares e Sócrates Golzio dos Santos do setor de Fitoquímica do PPgPNSB/CCS/UFPB, foi extraído e caracterizado conforme descrito por Xavier et al., 2015.

4.2.3 Linhagens de células tumorais e não tumoral

Para os ensaios de atividade antitumoral *in vitro* foram utilizadas linhagens de células tumorais humanas e, para avaliação da citotoxicidade, foi utilizada uma linhagem não tumoral humana (Quadro 1). As células de HCT-116, HeLa, SK-MEL-28, MDA-MB-231, PC-3 e HaCaT foram adquiridas no banco de células do Rio de Janeiro (RJ/Brasil). MCF-7 foi adquirida do Instituto Nacional do Câncer, Frederick, MA, EUA. Estas linhagens foram mantidas em meio de cultura RPMI-1640 ou DMEM suplementadas com 10% de soro fetal bovino, 100 U/ml penicilina e 100 µg/mL estreptomicina, mantidas em estufa a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂.

Quadro 1. Linhagens de células tumorais e não tumoral humanas

Linhagem celular	Tipo histológico
HCT-116	Carcinoma colorretal
HeLa	Colo de útero
MCF-7	Adenocarcinoma de mama
MDA-MB-231	Adenocarcinoma de mama
PC-3	Carcinoma de próstata
SK-MEL-28	Melanoma
HaCaT	Queratinócito (não tumoral)

Fonte: LOPES, 2021

4.3 MÉTODOS

4.3.1 Preparo da solução do óleo essencial de *L. microphylla* (OE-LM)

Após ser pesado, o óleo de *L. microphylla* (OE-LM) foi solubilizado em DMSO 0,5% (Dimetilsulfóxido) formando uma solução estoque de 20 mg/mL, que foi utilizada para obtenção das concentrações requeridas durante a execução dos ensaios *in vitro*.

4.3.2 Avaliação da citotoxicidade em células tumorais e não tumoral

A avaliação da citotoxicidade foi realizada por meio do ensaio de redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio), o qual é um método colorimétrico que mede indiretamente a citotoxicidade, proliferação ou viabilidade celular. O MTT é um sal de tetrazólio solúvel em água, o qual é convertido em cristais de formazan de cor púrpura, insolúveis em água, após clivagem do anel de tetrazólio por desidrogenases mitocondriais e outras enzimas lisossomais presentes em células metabolicamente ativas. Uma vez solubilizado, o formazan pode ser quantificado por espectrofotômetro e sua intensidade colorimétrica é diretamente proporcional ao número de células viáveis (MOSMANN, 1983).

As células (HCT-116, HeLa, MCF-7, PC-3, MDA-MB-231, SK-MEL-28 e HaCaT) foram semeadas em placas de 96 poços na concentração de 3×10^5 células/mL. Após 24 horas, o OE-LM, previamente dissolvido em DMSO, foi incubado em diferentes concentrações (9; 18,7; 37,5; 75; 150; 300 $\mu\text{g/mL}$) com a suspensão celular por 72 horas em uma estufa com 5% de CO_2 , a 37 °C. A doxorrubicina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi utilizada como droga padrão, e testada em concentrações variando entre 0,31 e 20 μM . Prosseguido o período de incubação, as placas foram centrifugadas (500 g, 5 minutos, 25 °C), o sobrenadante foi parcialmente removido e a solução de MTT adicionada (5 mg/mL em PBS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As placas foram incubadas por 3 horas, em seguida foi adicionado 100 μL de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10% e os cristais de formazan produzidos foram dissolvidos *overnight*. A absorbância foi mensurada em um espectrofotômetro (leitor de microplacas BioTek Instruments, Sinergy HT, Winooski, VT, EUA), no comprimento de onda de 570 nm. Para cada linhagem celular foram realizados três experimentos independentes em quadruplicada e a CI_{50} (concentração que produz 50% de inibição no crescimento celular) foi então determinada.

Para todas as linhagens, o índice de seletividade (IS) do OE-LM foi obtido a partir da razão entre a CI_{50} da célula não tumoral pela CI_{50} da célula tumoral (SERAFIM et al., 2018).

Posteriormente, o ensaio do MTT foi realizado apenas com a linhagem para a qual o OE-LM mostrou maior IS, a linhagem de melanoma SK-MEL-28. Nesse caso,

a citotoxicidade do óleo foi investigada também após os tratamentos de 24 e 48 horas, e a CI_{50} para cada um desses tempos foi determinada.

4.3.3 Análise do ciclo celular

As células da linhagem SK-MEL-28 foram incubadas (2×10^5 células em 1 mL) em placas de 24 poços com o OE-LM nas concentrações de 33 e 66 $\mu\text{g/mL}$ (correspondente aos valores da CI_{50} e o dobro da CI_{50}), por 48 horas. A doxorrubicina (4,0 μM) foi utilizada como droga padrão. Após o tratamento, as células foram removidas das placas usando uma solução de tripsina/EDTA, coletadas por centrifugação (500 x *g*, 5 minutos, 20°C) e ressuspensas em 1 mL de PBS. As amostras foram fixadas cuidadosamente em 4 mL de etanol 70% gelado, em vórtex, e congeladas (-20 °C) até a análise. No momento da análise, as células fixadas foram recuperadas por centrifugação (400 x *g*, 10 minutos, 4°C), realizando-se sucessivas lavagens com PBS em temperatura ambiente. Por fim, a suspensão celular (300 μL) foi incubada (protegido da luz, a 37°C, por 30 minutos) com 3 μL de RNase (0,1 mg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), para eliminar traços de RNA, e 15 μL de iodeto de propídeo (IP; 0,05 mg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), para corar o DNA (SILVA et al., 2019).

As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo FACSanto II (BD FACSCanto™ II, Woburn, MA, EUA), adquirindo-se 10.000 eventos/amostra. Foram realizados três experimentos independentes em duplicata e os dados foram analisados com o programa Flowing Software 2.5.1.

A proporção de células nas diferentes fases do ciclo celular (G1, S, G2, M), bem como células subdiploides (fração sub-G1) foi estimada, considerando que o marcador iodeto de propídeo se intercala ao DNA e, portanto, a intensidade de fluorescência do IP detectada pode ser relacionada com o conteúdo de DNA das células em cada fase do ciclo (JAYAT; RATINAUD, 1993). A fluorescência do IP aumenta de maneira proporcional à quantidade de DNA em cada fase, assim: I) células que não estão em divisão são encontradas na fase G0/G1 (Ploidia: 2n, diploide); II) células que iniciam o processo de duplicação do seu material genético estão na fase S (Ploidia: >2n); III) células com o DNA totalmente duplicado estão na

fase G2/M (Ploidia: 4n). Além disso, ainda pode ocorrer a formação de uma população com quantidade de DNA inferior à G1 (<2n), chamado de sub-G1 (DARZYNKIEWICZ; BEDNER; SMOLEWSKI, 2001; PÁRAL et al., 2018).

4.3.4 Avaliação da apoptose por laranja de acridina (LA) e iodeto de propídio (IP)

As células da linhagem SK-MEL-23 foram incubadas (2×10^5 células em 1mL) em placas de 24 poços com o OE-LM na concentração de 33 µg/mL por 48 horas. A doxorrubicina (4,0 µM) foi usada como droga padrão. Após o tratamento, as células foram coletadas por centrifugação (500 x g, 20 °C, 5 minutos), ressuspensas em PBS, marcadas com 10 µg/mL de laranja de acridina (µM) e iodeto de propídio (10 µg/mL) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA). O experimento foi realizado em triplicata. As células recém-coradas foram observadas sob microscópio confocal de varredura a laser (Leica, Alemanha). Os critérios para identificação foram os seguintes: (a) as células viáveis parecem ter um núcleo verde claro e uma estrutura intacta; (b) as células apoptóticas iniciais exibem um núcleo verde claro mostrando condensação da cromatina; (c) as células apoptóticas tardias mostram áreas alaranjadas densas (verde/vermelho) de condensação da cromatina e *blebs* de membrana; (d) as células necróticas parecem ter núcleo vermelho (RENVOIZÉ et al., 1998; TAN; NORHAIZAN, 2019).

4.3.5 Avaliação da apoptose pela dupla marcação com Anexina V-FITC e iodeto de propídeo

As células da linhagem SK-MEL-28 foram incubadas (2×10^5 células em 1 mL) em placas de 24 poços com o OE-LM nas concentrações de 33 µg/mL e 66 µg/mL por 48 horas. A doxorrubicina (4,0 µM) foi utilizada como droga padrão. Após o tratamento, as células foram removidas das placas usando uma solução de tripsina/EDTA, coletadas por centrifugação (500 x g, 5 minutos, 20 °C), lavadas em PBS, ressuspensas em um tampão de ligação (195 µL) e, 5 µL da Anexina V conjugada com fluoresceína (FITC) foi então adicionada, conforme instruções do

fabricante (eBioscience, Thermo Fisher, Rochester, NY). As células foram incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos, lavadas e ressuspensas novamente no tampão de ligação (190 µL). Em seguida, 10 µL do iodeto de propídeo (IP) (20 µg/mL) foi adicionado.

As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo FacsCanto II (BD FACSCanto™ II, Woburn, MA, EUA), adquirindo-se 10.000 eventos/amostra. Foram realizados três experimentos independentes em duplicata e os dados foram analisados com o programa Flowing Software 2.5.1.

A anexina V é uma proteína que se liga à fosfatidilserina, um fosfolípídeo que é translocado para a membrana extracelular durante a etapa inicial de ativação da apoptose. O IP, por outro lado, interage diretamente com o DNA de células que perderam a integridade da membrana, permitindo distinguir células em apoptose tardia ou necrose (RICCARDI; NICOLETTI, 2006; TAN; NORHAIZAN, 2019).

4.3.6 Avaliação da quantificação de espécies reativas de oxigênio (EROs)

A produção de espécies reativas de oxigênio foi avaliada utilizando o fluoróforo 2',7'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA). Esta molécula não fluorescente é muito sensível a variações no ambiente redox intracelular e quando penetra nas células vivas é clivada por esterases intracelulares, bem como oxidada na presença de espécies reativas de oxigênio, sendo convertida em DCF (2',7'-diclorofluoresceína), uma molécula altamente fluorescente (COSSARIZZA et al., 2009). Portanto, o número de células que emitirão fluorescência, detectadas por citometria de fluxo, é diretamente proporcional aos níveis de estresse oxidativo (FERREIRA et al., 2020; SANTOS et al., 2018).

As células da linhagem SK-MEL-28 foram incubadas (2×10^5 células em 1 mL) em placas de 24 poços com o OE-LM nas concentrações de 33 e 66 µg/mL, por 24 horas. Após o tratamento, as células foram removidas das placas usando uma solução de tripsina/EDTA, coletadas por centrifugação (500 x g, 5 minutos, 20 °C) e ressuspensas em 1 mL de PBS. Em seguida, as células (300 µL) foram marcadas com 6 µL de H₂DCFDA (10 µM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e incubadas no

escuro, durante 30 minutos, a 37 °C. Uma alíquota dessas amostras foi incubada com peróxido de hidrogênio (H₂O₂), na concentração final de 500 µM, utilizado como o controle positivo deste ensaio. O experimento foi realizado em triplicata.

4.4 Análise estatística

A determinação da CI₅₀ (concentração que produz 50% de inibição no crescimento celular) e seus respectivos intervalos de confiança (95%) foi realizada a partir de regressão não-linear. Nos demais ensaios, os dados estão expressos como média ± e.p.m (erro padrão da média) e foram comparados por análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Citotoxicidade em células tumorais e não tumoral

A citotoxicidade do óleo essencial de *Lippia microphylla* (OE-LM) foi avaliado em seis linhagens de células tumorais humanas (HCT-116, HeLa, SK-MEL-28, MCF-7, MDA-MB-231, PC-3) e em uma linhagem de célula não tumoral humana (HaCaT). Os resultados estão expressos como concentração que produz 50% de inibição no crescimento celular (CI_{50}) do OE-LM para cada linhagem celular e estão demonstrados na Tabela 2, juntamente com seus respectivos índices de seletividade.

Tabela 2. Citotoxicidade do óleo essencial das folhas de *Lippia microphylla* (OE-LM), utilizando o ensaio de redução do MTT após 72 horas de tratamento, e índice de seletividade (IS)

Linhagens	**CI_{50}		****IS	
	OE-LM ($\mu\text{g/mL}$)	***DXR (μM)	OE-LM	DXR
HCT-116	100,10 $\pm$ 1,12	2,57 $\pm$ 0,001	0,50	0,11
HeLa	90,33 $\pm$ 1,03	3,8 $\pm$ 1,1	0,65	0,07
SK-MEL-28	33,38 $\pm$ 1,16	4,0 $\pm$ 1,92	1,76	0,07
MCF-7	37,0 $\pm$ 1,25	*NT	1,58	-
MDA-MB-231	117,0 $\pm$ 1,22	*NT	0,50	-
PC-3	54,99 $\pm$ 1,12	*NT	1,06	-
HaCaT	58,73 $\pm$ 1,10	0,28 $\pm$ 0,001	-	-

Fonte: LOPES, 2021

Legenda: Dados obtidos a partir de três experimentos independentes realizados em quadruplicata e apresentados em valores de CI_{50} obtidos por regressão não linear com intervalo de confiança de 95%. Os valores de CI_{50} estão expressos em $\mu\text{g/mL} \pm \text{SEM}$.

*NT: Não Testado

** CI_{50} : Concentração que produz 50% de inibição do crescimento celular

***DXR: Doxorrubicina (droga padrão)

****IS: Índice de seletividade (CI_{50} da célula não tumoral (HaCaT)/ CI_{50} da linhagem tumoral)

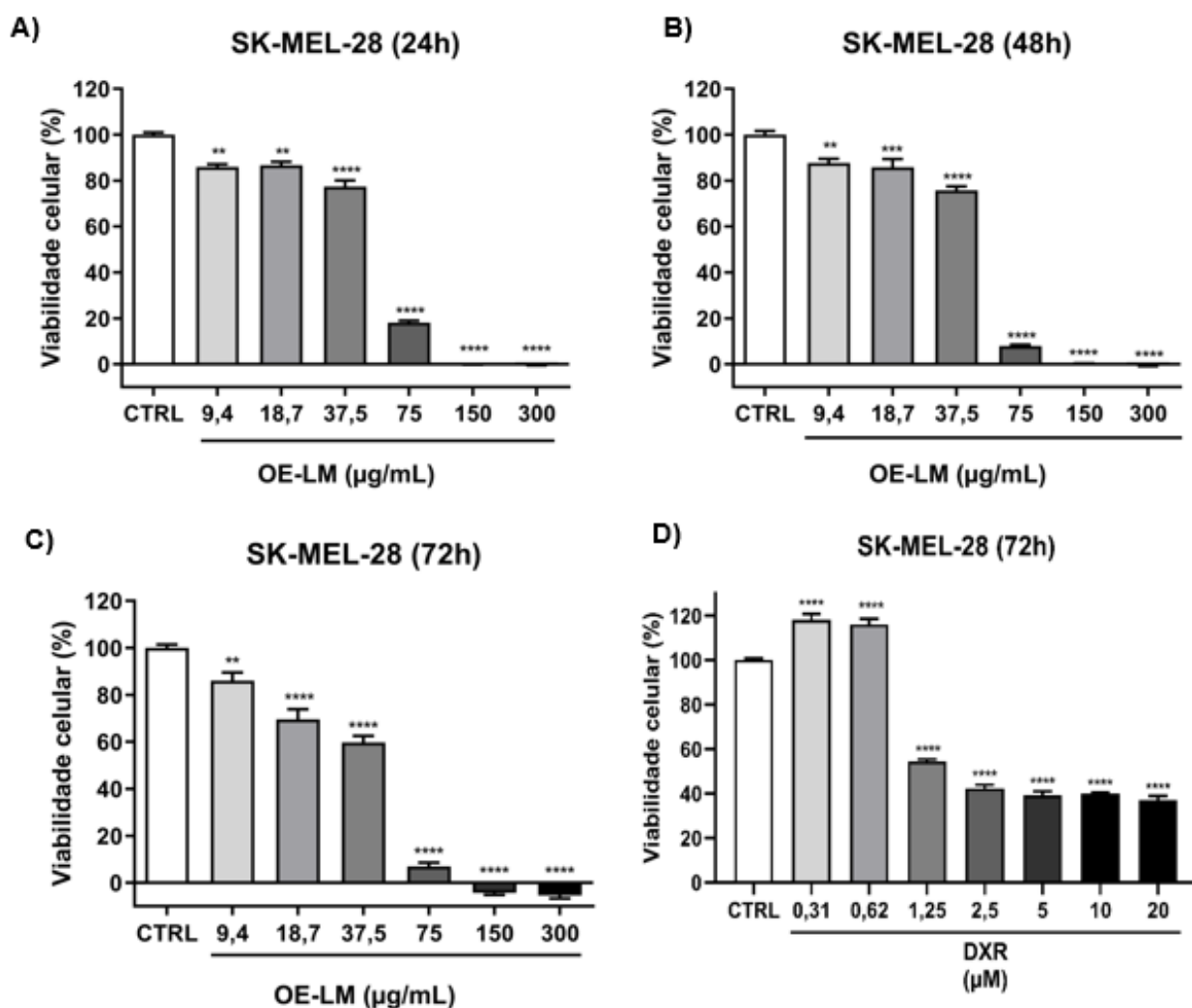
A citotoxicidade de OE-LM variou entre as diferentes linhagens celulares, sendo a linhagem menos sensível a MDA-MB-231 de câncer de mama ($CI_{50} = 117,0 \pm 1,22 \mu\text{g/mL}$), e a mais sensível a linhagem de melanoma SK-MEL-28 (CI_{50} de $33,38 \pm 1,16$

µg/mL) no tempo de 72 h. A droga padrão, doxorrubicina, apresentou efeito citotóxico em células tumorais, com valores de CI_{50} variando de $2,57 \pm 0,001 \mu M$ em HCT-116 a $4,0 \pm 1,92 \mu M$ em SK-MEL-28, após 72 horas de tratamento.

A partir dos resultados de CI_{50} determinou-se o índice de seletividade (IS) da doxorrubicina e do OE-LM para as células tumorais em relação às células não tumorais da linhagem HaCaT. Para a droga padrão, os dados mostram que este fármaco possui IS variando de 0,07 em SK-MEL-28 e HeLa a 0,11 em HCT-116. Para o óleo essencial em estudo, os dados do IS mostram que SK-MEL-28 foi a linhagem para a qual o OE-LM mostrou-se mais seletivo (IS: 1,76). Dessa forma, selecionou-se a linhagem SK-MEL-28 para investigação do efeito antitumoral desse óleo essencial.

Então, foi investigado o efeito citotóxico do óleo nos tempos de 24 h e 48 h de tratamento, sendo obtidos os valores de CI_{50} de $48,60 \pm 1,10 \mu g/mL$ e $46,74 \pm 1,07 \mu g/mL$, respectivamente (Figura 7A e B).

Figura 7. Efeito do OE-LM* e DXR** sobre a viabilidade de células da linhagem SK-MEL-28 após 24, 48 e 72 horas de tratamento.



Fonte: LOPES, 2021

Legenda: Dados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos independentes em quadruplicata analisados por ANOVA seguido por Tukey.

No gráfico ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ comparado ao grupo controle

*OE-LM: Óleo essencial de *Lippia microphylla*

**DXR: Doxorrubicina

5.1 Análise do ciclo celular

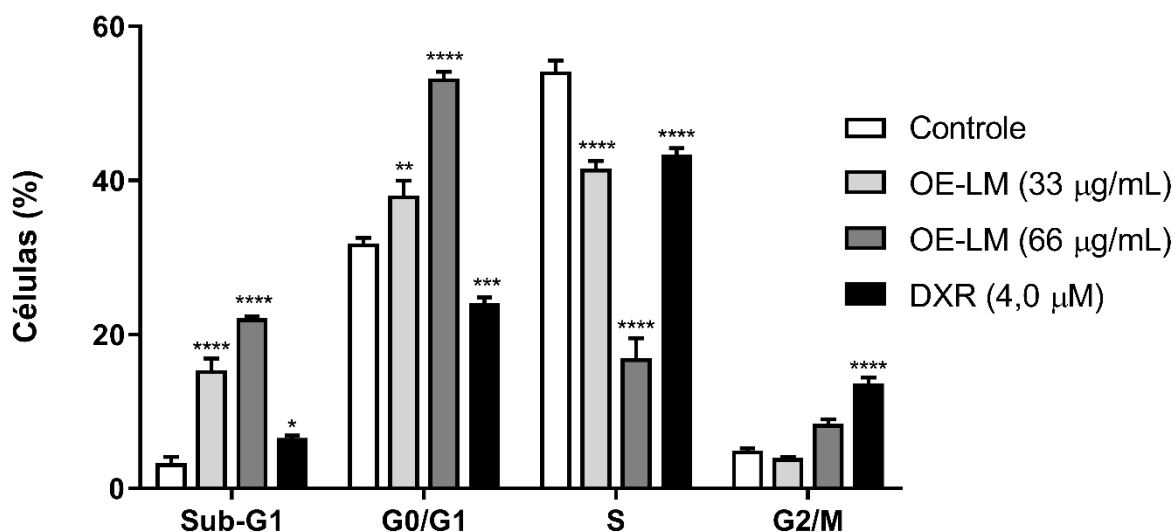
O tratamento de 48 h com o OE-LM induziu um aumento significativo no percentual de células em sub-G1, tanto na concentração de 33 µg/mL ($15,36 \pm 1,49\%$; $p < 0,0001$) quanto na concentração de 66 µg/mL ($22,08 \pm 0,27\%$; $p < 0,0001$), e também na fase G0/G1 para as duas concentrações com valores de $38,05 \pm 1,8\%$ ($p < 0,01$) e $53,20 \pm 0,8\%$ ($p < 0,0001$), respectivamente, quando comparados ao grupo controle (Sub-G1: $3,27 \pm 0,7\%$; G0/G1: $31,82 \pm 0,69\%$).

Esses resultados foram acompanhados de uma redução significativa da porcentagem de células na fase S nas concentrações de 33 e 66 µg/mL do OE-LM ($41,53 \pm 0,98\%$ e $16,8 \pm 2,59\%$, respectivamente; $p < 0,0001$ para ambos) em comparação ao grupo controle ($54,14 \pm 1,4\%$).

Em relação a fase G2/M, não houve alteração significativa nos grupos tratados com OE-LM ($3,96 \pm 0,15\%$ na concentração de 33 µg/mL e $8,39 \pm 0,54\%$ na concentração de 66 µg/mL), em comparação com o controle ($4,92 \pm 0,28\%$).

O tratamento com doxorrubicina induziu um aumento significativo das células em sub-G1 ($6,53 \pm 0,34\%$), quando comparadas ao controle ($3,27 \pm 0,7\%$) ($p < 0,001$). Observa-se também uma significativa diminuição nas fases G0/G1 ($24,09 \pm 0,7\%$; $p < 0,001$) e S ($43,33 \pm 0,85\%$; $p < 0,0001$), quando comparados ao controle (G0/G1: $31,82 \pm 0,6\%$; S: $54,14 \pm 0,6\%$), seguido de um aumento significativo na fase G2/M ($13,65 \pm 0,74\%$) em comparação ao controle que foi de $4,97\% \pm 0,2\%$ ($p < 0,0001$).

Figura 8 - Efeito do tratamento (48 horas) com o OE-LM* (33 e 66 µg/mL) e DXR** (4,0 µM) na progressão do ciclo celular em células da linhagem SK-MEL-28



Fonte: LOPES, 2021.

Legenda: Representação gráfica dos resultados obtidos por citometria de fluxo. Os dados são expressos como média ± e.p.m. de três experimentos independentes em duplicata analisados por ANOVA seguido por Tukey (**p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001 em relação ao controle).

*OE-LM: Óleo essencial de *Lippia microphylla*

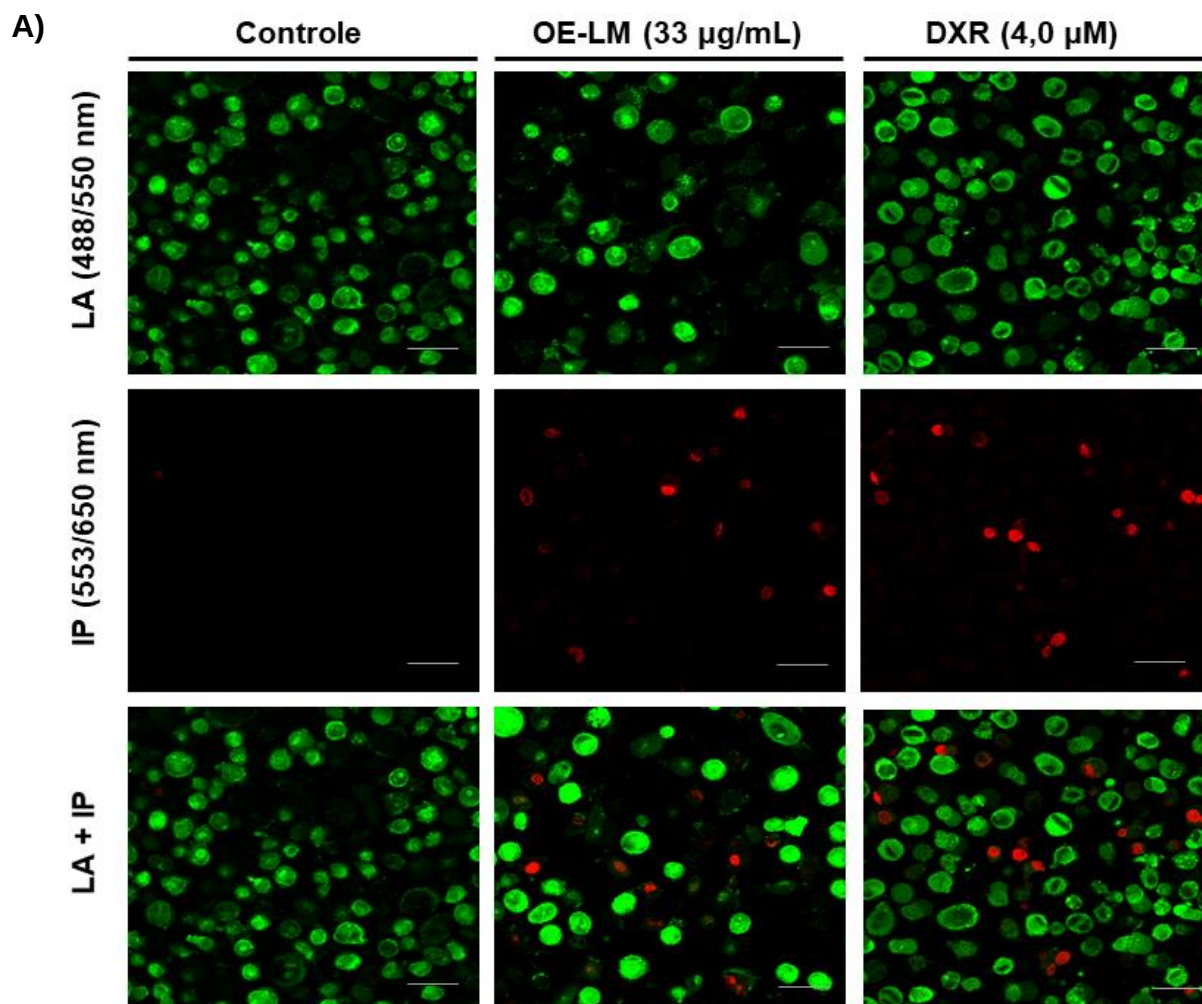
**DXR: Doxorrubicina

5.2 Avaliação da apoptose por laranja de acridina (LA) e iodeto de propídio (IP)

A figura 9 mostra células da linhagem SK-MEL-28 duplamente marcadas com laranja de acridina e iodeto de propídio, analisadas por microscopia confocal. Após o tratamento com o OE-LM (33 µg/mL) ou com a doxorrubicina (4,0 µM) pelo período de 48 h, as células em apoptose foram diferenciadas pela coloração verde-brilhante do seu núcleo. Células em necrose ou mortas (núcleo vermelho) também foram visualizadas após os tratamentos com OE-LM e DXR. O oposto observa-se no grupo controle (células não tratadas), no qual as células apresentaram uma estrutura intacta, tamanho morfolologicamente homogêneo e núcleo com coloração verde-claro (Figura 9A).

Ainda, é possível observar na figura tridimensional que as células SK-MEL-28, após tratamento com OE-LM, apresentam características típicas de apoptose, indicadas pelas setas na figura 8B, como a formação de *blebs* na membrana e corpos apoptóticos (Figura 9B).

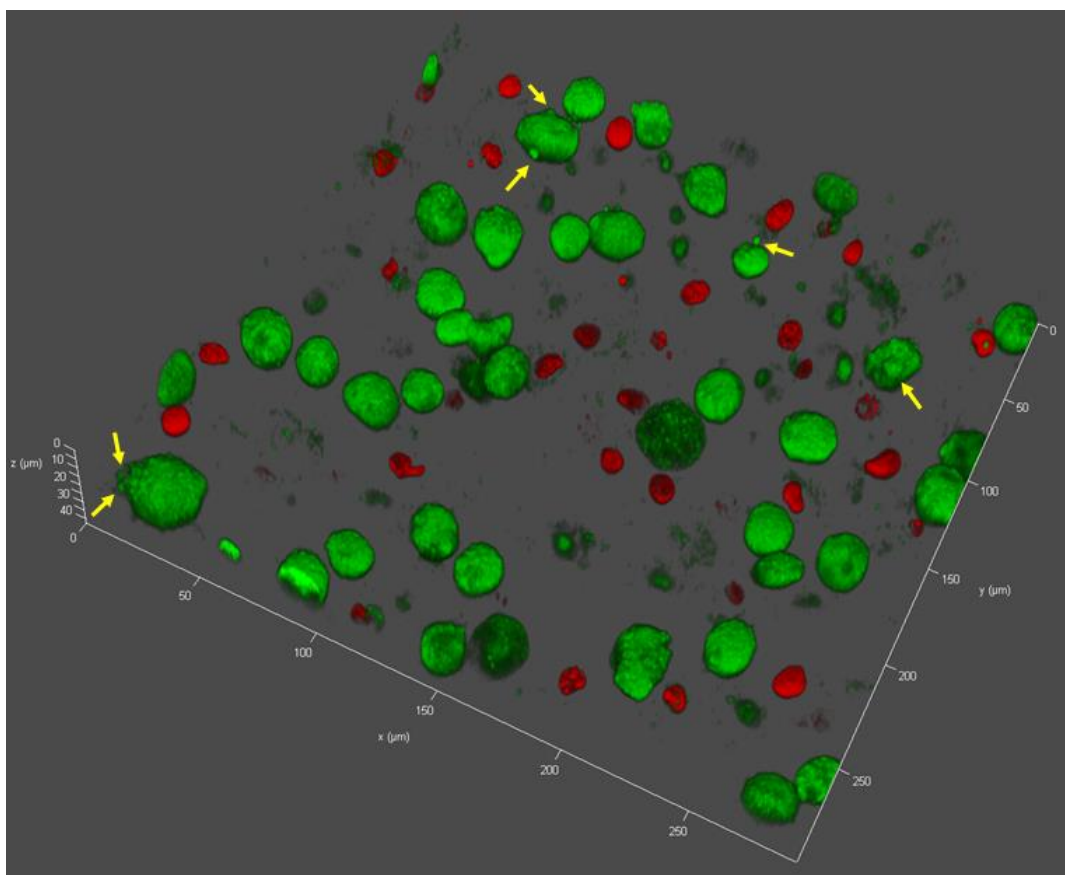
Figura 9. Efeito do tratamento de 48 horas com o OE-LM* (33 µg/mL) e DXR** (4,0 µM) em células da linhagem SK-MEL-28 duplamente marcadas com laranja de acridina e iodeto de propídeo



Fonte: LOPES, 2021.

Legenda: (A) Imagens representativas obtidas por microscopia confocal de varredura a laser, com ampliação de 400-630x (barra de escala = 50 µm). As células da linhagem SK-MEL-28 foram diferenciadas com base nos seguintes critérios: células viáveis apresentam estrutura intacta e núcleo verde claro; células em apoptose inicial exibem um núcleo verde brilhante e condensação da cromatina; células em apoptose tardia mostram áreas alaranjadas densas (verde/vermelho) de condensação da cromatina e *blebs* de membrana; células necróticas/mortas apresentam um núcleo vermelho. *Nota:* LA (laranja de acridina); IP (iodeto de propídeo). *OE-LM: Óleo essencial de *Lippia microphylla* **DXR: Doxorubicina

B)



Fonte: LOPES, 2021.

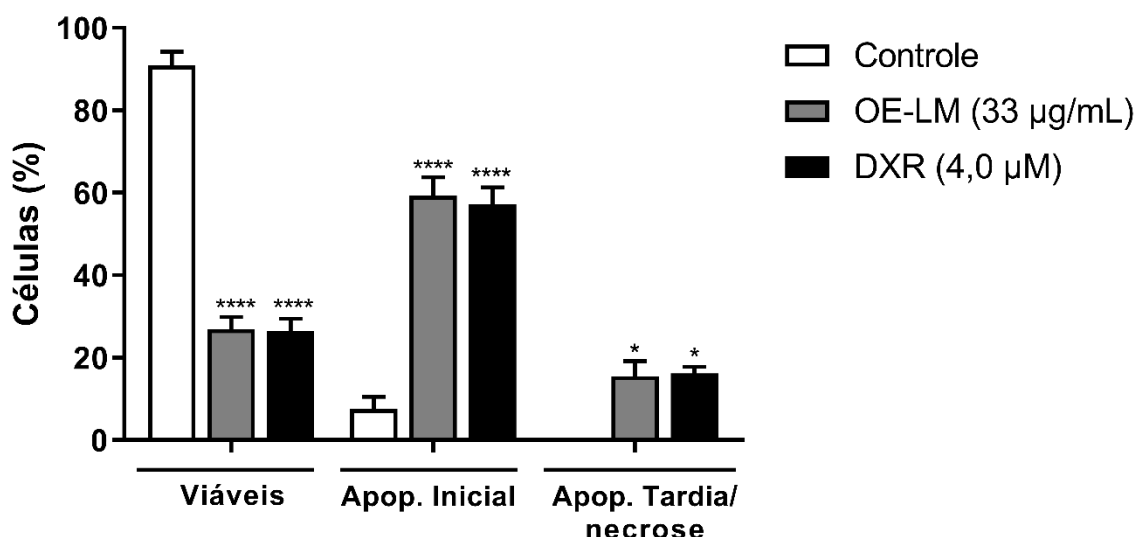
Legenda: Imagem em 3D representativa de células da linhagem SK-MEL-28 tratadas com o OE-LM (33 µg/mL) marcadas com a dupla coloração. **(B)** Visualização de características morfológicas próprias de apoptose. As setas pretas indicam a formação de *blebs* de membrana e corpos apoptóticos.

Nota: LA (laranja de acridina); IP (iodeto de propídeo).

*OE-LM: Óleo essencial de *Lippia microphylla*

Os dados quantitativos referentes à análise morfológica por microscopia confocal estão expressos na figura 10, na qual é possível observar que o número de células em apoptose inicial aumentou de $7,56 \pm 1,8\%$ (grupo controle) para $59,39 \pm 3,7\%$ após o tratamento com o OE-LM (33 µg/mL) ($p < 0,0001$). Ainda, o número de células em apoptose tardia/necrose aumentou de $0,0\%$ (grupo controle) para $15,58\% \pm 2,2$ após o tratamento com OE-LM ($p < 0,05$). Já a doxorrubicina (droga padrão) elevou a apoptose inicial de $7,56\% \pm 1,8$ (grupo controle) para $56,60 \pm 3,2\%$ ($p < 0,0001$); assim como aumentou a apoptose tardia/necrose de $0,0\%$ (grupo controle) para $16,20\% \pm 1,2$ ($p < 0,05$).

Figura 10. Efeito do tratamento de 48 horas com o OE-LM* (33 µg/mL) e DXR** (4,0 µM) em células da linhagem SK-MEL-28 duplamente marcadas com laranja de acridina e iodeto de propídeo



Fonte: LOPES, 2021.

Legenda: Avaliação da apoptose por coloração de laranja de acridina (LA) e iodeto de propídeo (IP). Os dados são expressos como média ± e.p.m. de células contadas em 3 campos em duplicatas e analisados por ANOVA seguido de Bonferroni's. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001 em relação ao controle.LA (laranja de acridina); IP (iodeto de propídeo).

*OE-LM: Óleo essencial de *Lippia microphylla*

**DXR: Doxorrubicina

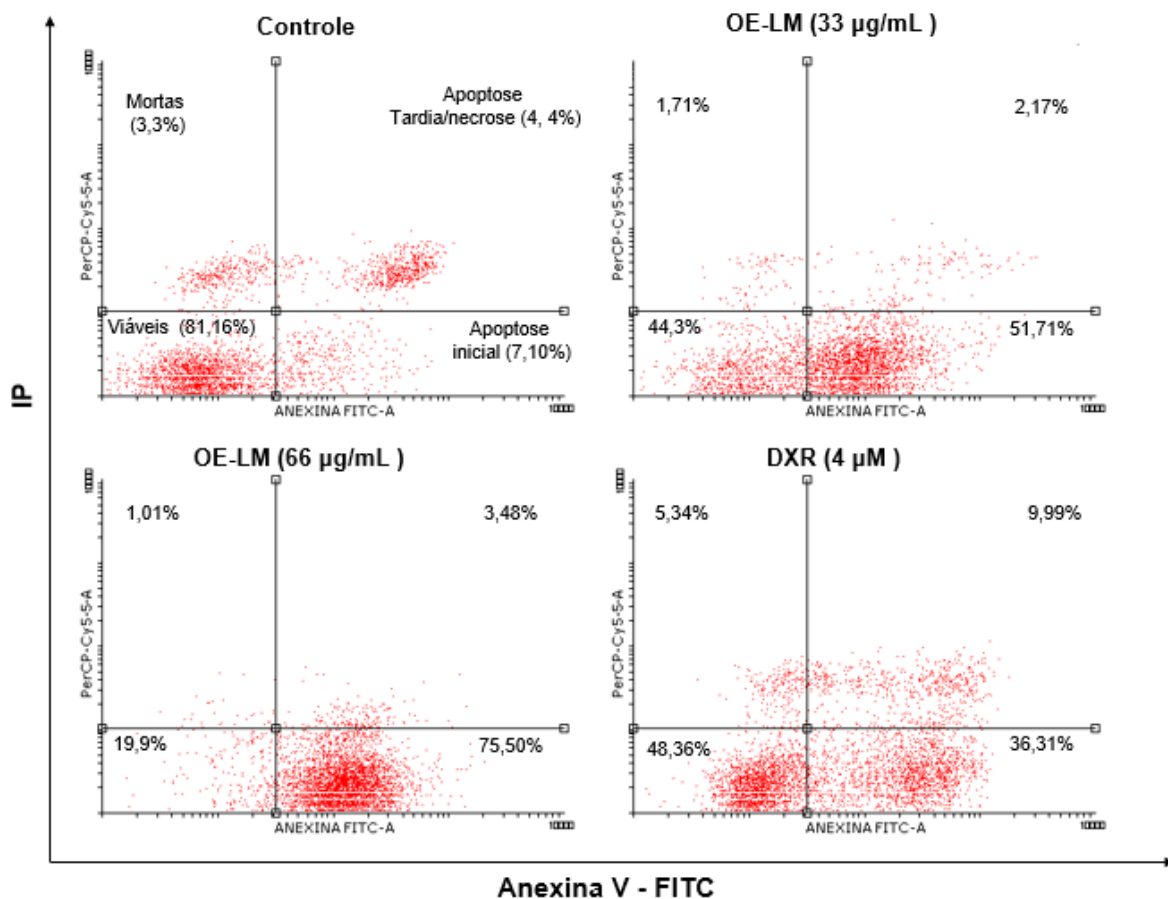
5.3 Avaliação da apoptose pela dupla marcação com Anexina V-FITC e iodeto de propídeo (IP)

Para confirmar o indicativo de apoptose, as células da linhagem SK-MEL-28 foram duplamente marcadas com anexina V/ IP e analisadas por citometria de fluxo. Como mostrado nas figuras 11 e 12, a proporção de células em apoptose inicial (anexina+ / IP-, quadrante inferior direito no dotplot) aumentou significativamente de $7,10 \pm 0,34\%$ (controle) para $51,71 \pm 0,3\%$ na concentração de 33 µg/mL do OE-LM ($p<0,0001$) e para $75,50 \pm 0,8\%$ ($p<0,0001$) na concentração de 66 µg/mL do óleo, após 48 h de tratamento. Em relação as células duplamente marcadas (anexina+ /

PI+, quadrante superior direito no dotplot), que indicam células em apoptose tardia ou necrose, não foi observado alteração significativa após o tratamento com o OE-LM.

No que diz respeito a doxorubicina, a proporção de células em apoptose inicial aumentou significativamente de $7,10 \pm 0,34\%$ (controle) para $36,31 \pm 1,52\%$ ($p < 0,0001$), assim como aumentou o número de células em apoptose tardia de $4,40 \pm 0,29\%$ para $9,99 \pm 1,52\%$, porém não foi significativo (Figura 11 e 12)

Figura 11. *Dotplots* representativos de células da linhagem SK-MEL-28 duplamente marcadas com Anexina V-FITC e iodeto de propídeo, após tratamento de 48 h com OE-LM* (33 e 66 µg/mL) e DXR** (4,0 µM)



Fonte: LOPES, 2021

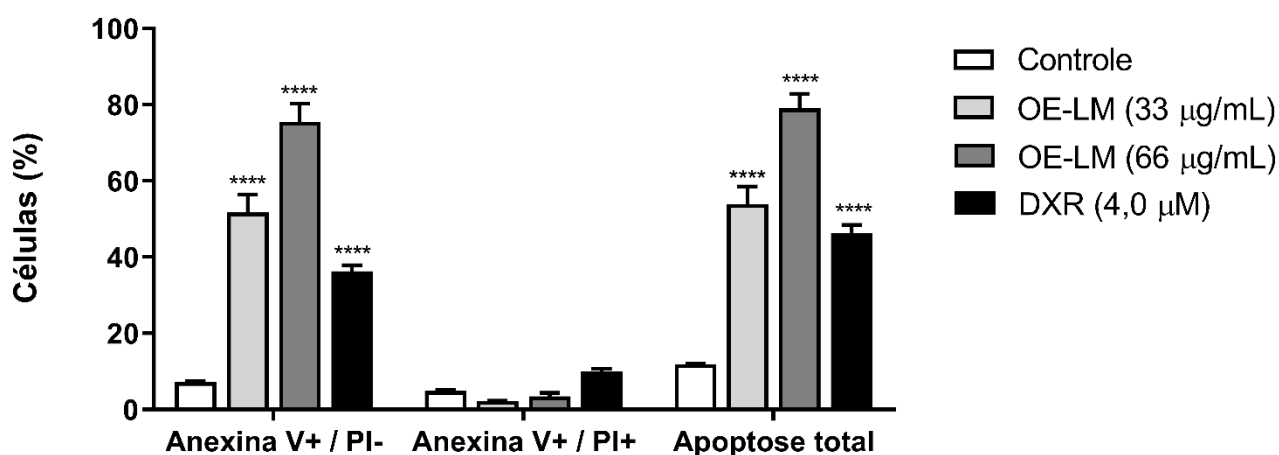
Legenda: *Dotplots* representativos obtidos por análise de citometria de fluxo. Os *dotplots* foram divididos em quatro quadrantes que representam diferentes populações celulares: Células viáveis (anexina - / IP -, quadrante inferior esquerdo), células em apoptose inicial (anexina + / IP -, quadrante inferior direito), células em apoptose tardia/ necrose (anexina + / IP +, quadrante superior direito), células mortas (anexina - / IP +, quadrante superior esquerdo). Foram obtidos 10.000 eventos/amostra por meio dos detectores de fluorescência vermelha (IP: 325-488 nm) e verde (FITC: 493-525 nm).

Nota: FITC (isotiocianato de fluoresceína); IP (iodeto de propídeo).

*OE-LM: Óleo essencial de *Lippia microphylla*

**DXR: Doxorubicina

Figura 12 - Efeito do tratamento de 48 h com OE-LM* (33 e 66 µg/mL) e DXR** (4,0 µM) em células da linhagem SK-MEL-28 duplamente marcadas com Anexina V- FITC e iodeto de propídeo



Fonte: LOPES, 2021.

Legenda: Representação gráfica dos resultados obtidos a partir dos *dotplots*. A porcentagem de células em apoptose inicial (anexina + / IP -) e tardia (anexina + / IP +), bem como os valores de apoptose total (inicial + tardia) foi evidenciada. Os dados são expressos como média ± e.p.m. de um experimento independente em triplicata, analisado por ANOVA seguido pelo teste de Tukey. (**p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001 em relação ao controle).

Nota: *FITC (isotiocianato de fluoresceína); IP (iodeto de propídeo).

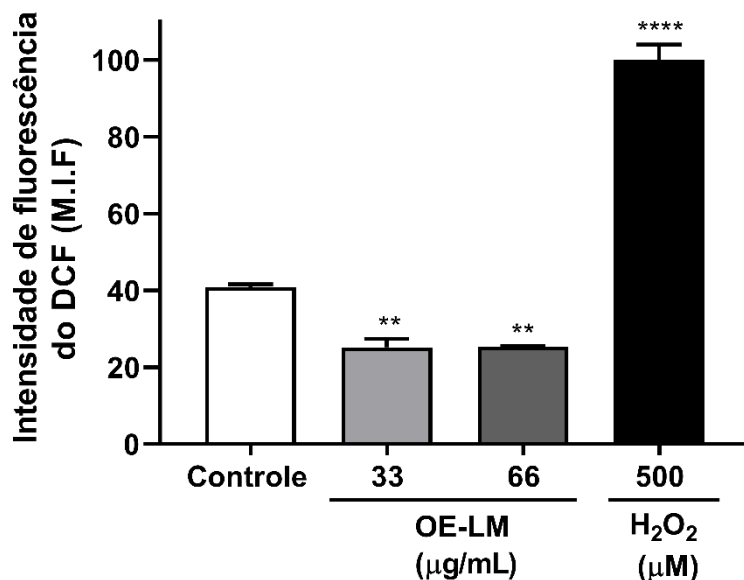
**OE-LM: Óleo essencial de *Lippia microphylla*

***DXR: Doxorubicina

5.4 Quantificação de espécies reativas de oxigênio

O efeito do tratamento de 24 horas com o OE-LM sobre a produção de EROs encontra-se expresso na Figura 13. É possível observar que o OE-LM reduziu significativamente a produção de EROs, relação ao controle ($40,90 \pm 0,68\%$), nas duas concentrações avaliadas (33 µg/mL: $25,23 \pm 0,9\%$; e 66 µg/mL: $25,39 \pm 0,17\%$; p<0,01 para ambas). Por outro lado, no grupo H₂O₂ é possível observar um aumento significativo da intensidade de fluorescência do DCF ($96,30 \pm 2,5\%$) (p<0,0001), conforme observado na figura 13.

Figura 13. Efeito do OE-LM* (33 e 66 µg/mL) na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em células SK-MEL-28 após 24 horas de tratamento



Fonte: LOPES, 2021.

Legenda: Representação gráfica dos resultados obtidos por citometria de fluxo. Os dados são expressos como média ± e.p.m. de três experimentos independentes em duplicata analisados por ANOVA seguido por Tukey (**p<0,01; ****p<0,0001 em relação ao controle). *Nota:* M.I.F.: Média da intensidade de fluorescência. DCF: 2',7'-diacetato diclorofluoresceína.

*OE-LM: Óleo essencial de *Lippia microphylla*

**H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

Discussão

6 DISCUSSÃO

Estudos da atividade antitumoral de óleos essenciais são bem descritos na literatura e diferentes mecanismos de ação tem sido atribuído a esse efeito, tais como, atividade antiproliferativos (SPYRIDOPOULOU et al., 2019); reguladores de redox celular (SPYRIDOPOULOU et al., 2017); indutores de parada do ciclo celular (FITSIOU et al., 2016), e efeitos anti-migratórios e pró-apoptóticos (KUMAR et al., 2016; SPYRIDOPOULOU et al., 2021). Em adição, uma revisão da atividade anticâncer de óleos essenciais concluiu que a teoria da ação sinérgica parece ser significativa e, portanto, para fins biológicos, destaca-se a importância de se estudar todo o óleo essencial em relação aos seus componentes separadamente (BHALLA et al., 2013).

Na família Verbenaceae, o gênero *Lippia* produz grandes quantidades de misturas voláteis. Estudos químicos demonstraram que os principais constituintes do óleo de *L. microphylla* são o timol, seu isômero carvacrol e o *p*-cimeno (XAVIER, 2015). Contudo é importante destacar que a composição química dos óleos essenciais pode variar muito devido a fatores fisiológicos, ambientais, genéticos e condições de armazenamento (SANLI et al., 2017; SHARMEEN et al., 2021).

Para o presente estudo, inicialmente, a atividade antitumoral do OE-LM foi avaliada em diferentes linhagens de células tumorais humanas, utilizando o ensaio do MTT (brometo de 3- [4,5- dimetiltiazol-2-il] -2,5 difenil tetrazólio), uma das principais técnicas empregadas para avaliar a viabilidade celular (KUMAR; NAGARAJAN; UCHIL, 2018). Então, buscou-se determinar a CI_{50} (concentração que produz 50% de inibição no crescimento celular) em seis linhagens tumorais (HCT-116, HeLa, MCF-7, MDA-MB-231, PC-3 e SK-MEL-28) e uma linhagem não tumoral (HaCaT), após 72 h de tratamento. Dentre as linhagens pesquisadas observou-se que a linhagem SK-MEL-28 foi a mais sensível ao poder citotóxico do óleo, sendo a escolhida para ensaios posteriores de investigação da ação antitumoral.

SK-MEL-28 é uma linhagem celular aderente de melanoma maligno humano (ATCC, 2021). O melanoma cutâneo, causado principalmente pela exposição à luz ultravioleta, é o câncer de pele mais perigoso e o mais frequente no Brasil, correspondendo a 30% de todos os tumores registrados, resultando em 90% das

mortes por todos os cânceres de pele (INCA, 2020; LOAN et al., 2019). A cirurgia é geralmente considerada um tratamento típico para melanoma localizado. Abordagens multidisciplinares, incluindo quimioterapia, imunoterapia e radioterapia, são realizadas em casos avançados para melhorar o prognóstico, uma vez que melanomas avançados apresentam alta agressividade e característica metastática (ZHANG et al., 2021; HEISTEIN et al., 2021).

Estudos sobre a citotoxicidade do OE-LM ainda são escassos, entretanto Xavier et al. (2015) demonstrou que o OE-LM possui atividade citotóxica *in vitro* em células da linhagem K562 (leucemia mieloide crônica humana) com CI_{50} de 60,05 $\mu\text{g/mL}$; e CI_{50} de 100,1 $\mu\text{g/mL}$ em células de sarcoma 180 (sarcoma murino) pela metodologia do ensaio do MTT. O fitocomplexo ainda apresentou efeito antitumoral *in vivo* em modelo de Sarcoma 180 em camundongos com taxa de inibição do crescimento tumoral em 32,2% e 59,8% para doses de 50 e 100mg/kg. Esses dados, em conjunto, apontam para o potencial antitumoral do referido óleo.

Ademais, naftoquinonas isoladas do óleo de *L. microphylla* demonstraram potencial citotóxico contra diferentes linhagens de células de câncer murino e humano, a citar, B-16 (melanoma murino), CEM (leucemia linfocitária), HL-60 (leucemia promielocítica), HCT-8 (côlon adenocarcinoma) e MCF-7 (adenocarcinoma de mama), com valores de CI_{50} variando de 0,69 a 3,13 $\mu\text{g/mL}$ (SANTOS et al., 2003; SIMÕES et al., 2015).

Em relação a outras espécies de *Lippia*, um estudo demonstrou que o óleo essencial de *L. citriodora* apresentou atividade citotóxica em HepG2 (carcinoma hepatocelular), MCF-7 (adenocarcinoma de mama) e CaCO2 (adenocarcinoma de cólon) com valores de CI_{50} de $74 \pm 2,8 \mu\text{g/mL}$, $89 \pm 1,4 \mu\text{g/mL}$ e $71 \pm 2,6 \text{ mg/mL}$, respectivamente. Ainda foi observado que óleo foi mais citotóxico contra as células da linhagem A375 (melanoma) ($CI_{50} = 9,1 \pm 0,6 \mu\text{g/mL}$), uma atividade de oito a dez vezes maior em comparação com as outras linhagens testadas (FITSIOU et al., 2018). O mesmo foi observado no presente trabalho para o OE-LM em que a CI_{50} — para algumas linhagens — é aproximadamente o triplo da CI_{50} na linhagem de melanoma SK-MEL-28.

Em relação à citotoxicidade dos componentes majoritários do OE-LM, é descrito na literatura que o carvacrol inibe a viabilidade e proliferação de células das

linhagens A549 (câncer de pulmão), HepG2 (hepatocarcinoma) (ÖZKAN; ERDOGAN, 2011; MELUSOVA et al., 2014), Caco-2 e HCT-116 (ambas de câncer colorretal) (LLANA-RUIZ-CABELLO et al., 2014; PAKDEMIRLI et al., 2020), MDA-MB-231 e MCF-7 (ambas de câncer de mama) (LI et al., 2021), HeLa e SiHa (câncer cervicais) (MEHDI et al., 2011), DU 145 e PC-3 (ambas de câncer de próstata) (LUO et al., 2016), com concentrações que variam de 100 a 1.000 μM . Da mesma forma, o timol também apresenta efeito citotóxico nas células das linhagens A549, H460 e H1299 (COCCIMIGLIO et al., 2016; DE-LA-CHAPA et al., 2018; BALAN et al., 2021), HepG2 (ÖZKAN; ERDOGAN, 2011; ELSHAFIE et al., 2017), HCT-116 (CHAUHAN et al., 2018), MDA-MB-231 e MCF-7 (ELBE et al., 2020), e HeLa (ABED, 2011) com concentrações que variam de 30 a 600 μM .

Para o OE-LM, a partir dos valores de CI_{50} , calculou-se o índice de seletividade (IS), o qual permite deduzir se o composto é mais seletivo ou não para células tumorais em comparação as não tumorais. A amostra teste que apresentar valor igual ou superior a dois pode ser considerada como seletiva (DE OLIVEIRA et al., 2015; PILON et al., 2020). Dentre os valores obtidos para o OE-LM nas diferentes linhagens, pode-se observar que o maior IS foi obtido para a linhagem SK-MEL-28. Apesar do índice calculado ser menor do que dois, a amostra foi considerada promissora, considerando que a droga padrão doxorrubicina apresentou IS ainda mais baixo e é uma droga usada clinicamente para tratar diferentes tipos de câncer. Então, a baixa seletividade de drogas antitumorais é bem descrita na literatura considerando que células não tumorais são também sensíveis a ação de agentes antineoplásicos (ESKANDARI et al., 2020)

Então, partindo do pressuposto que o câncer do tipo melanoma é de difícil tratamento, com altas taxas de mortalidade, e que o óleo de *L. microphylla* (OE-LM) apresentou atividade citotóxica em células da linhagem SK-MEL-28, o uso do OE-LM torna-se uma opção promissora na busca de tratamentos futuros para o melanoma.

A próxima etapa deste estudo buscou caracterizar o efeito antitumoral *in vitro* do OE-LM na linhagem SK-MEL-28, sendo investigado esse efeito após 48 horas de incubação com o óleo, nas concentrações correspondentes a CI_{50} (33 $\mu\text{g/mL}$) e ao dobro da CI_{50} (66 $\mu\text{g/mL}$), escolhidas a partir dos estudos de citotoxicidade.

Inicialmente foi avaliada a distribuição das células nas diferentes fases do ciclo celular, uma vez que o ciclo celular é um processo alvo da ação de muitos fármacos antineoplásicos, como o 5-fluorouracil, os alcaloides da vinca (vinblastina e vincristina), a doxorrubicina, entre outros (MILLS; KOLB; SAMPSON, 2018).

Para a análise do ciclo celular foi usado o ensaio de marcação com iodeto de propídeo, um marcador fluorescente que intercala o DNA e, portanto, a quantidade de marcação observada é proporcional a quantidade de DNA da amostra, o que é usado para identificar células nas diferentes fases do ciclo celular. Assim, é possível distinguir entre células presentes na fase G0/G1, que são diploides ($2n$) e não estão se dividindo, células em processo de divisão celular que iniciam a duplicação do seu material genético na fase S ($>2n$), e células que apresentam o material genético totalmente duplicado na fase G2/M ($4n$) (PÁRAL et al., 2018; WENZEL; SINGH, 2018).

Os resultados demonstram que o OE-LM induziu aumento no pico sub-G1, o que significa que ocorreu a presença de uma fração de células com quantidade de DNA inferior à do G1 ($<2n$). Dados da literatura relacionam o aparecimento do pico sub-G1 como um indicativo do processo de apoptose, já que na análise por citometria de fluxo os eventos que apresentam uma quantidade de DNA inferior a G1 normalmente correspondem a células com DNA fragmentado, indicando a presença de corpos apoptóticos (JERNEI et al., 2019; RICCARDI; NICOLETTI, 2006; SOMMA et al., 2019).

Ainda no resultado de ciclo celular foi possível observar um aumento do percentual de células na fase G0/G1 e uma redução na fase S, dados que corroboram com Arunasree et al., (2010), que demonstraram que o carvacrol (um dos componentes majoritários do OE-LM) promoveu um aumento no percentual de células na fase G0/G1 do ciclo celular, seguido de número reduzido de células na fase S na linhagem de câncer de mama MDA-MB-231.

Em adição, dados da literatura mostram que o carvacrol diminuiu a expressão da proteína CDK4, uma cinase dependente de ciclina responsável pela inativação/fosforilação da proteína retinoblastoma no ponto de verificação de transição de fase G1/S, em linhagem de carcinoma de células escamosas da língua humana (Tca-8113) e em linhagem de câncer de mama (MCF-7) (DAI et al., 2016; MARI et al., 2020; LI et al., 2021). Além disso, foi observado também que o carvacrol diminuiu a

expressão de CDK6 em células MCF-7 (MARI et al., 2020). Os medicamentos inibidores de CDK estão sendo usados em alguns tipos de câncer, como leucemia mieloide aguda e câncer de mama (PERNAS et al., 2018; LEE; ZEIDNER, 2019). De fato, compostos naturais vêm demonstrando atuar como moduladores do ciclo celular, interrompendo a divisão e induzindo apoptose (SAMPAIO et al., 2021).

Partindo do pressuposto que diversos fármacos anticâncer atuam por indução de apoptose e que o aparecimento do pico sub-G1 após o tratamento com o OE-LM é indicativo de apoptose, buscou-se avaliar esse mecanismo por meio da dupla marcação com laranja de acridina e iodeto de propídeo na microscopia confocal. As imagens mostram que as células marcadas exibem características morfológicas típicas da apoptose, tais como formação de corpos apoptóticos e *blebs* na membrana plasmática. A quantificação desses dados, como esperado, evidenciou aumento nas células em apoptose.

Para consolidar a avaliação da indução de apoptose, as células foram analisadas por citometria de fluxo, no qual foi observado aumento de células marcadas apenas com Anexina V, essa que se liga à fosfatidilserina externalizada, representando um dos primeiros eventos quando esse mecanismo de morte celular é ativado. Em condições biológicas a exposição à fosfatidilserina serve como um sinal para os macrófagos eliminarem as células apoptóticas (MAJTNEROVÁ; ROUŠAR, 2018; SARASTE; PULKKI, 2000).

Dados da literatura mostram que o óleo da espécie de *L. citriodora* também apresenta atividade apoptótica *in vitro* em células da linhagem DA3 (câncer de mama murino) por meio da marcação com Anexina V por citometria. Nesse estudo, após tratamento por 48 h as células exibiram um aumento de 30% a 517% na proporção de células apoptóticas precoces em relação às células viáveis (SPYRIDOPOULOU et al., 2021).

Em relação aos componentes do OE-LM, sabe-se que o carvacrol induziu citotoxicidade em linhagem de célula de melanoma B16-F10 e A375 murino (SATOOKA; KUBO, 2012; FERRAZ et al., 2013; GOVINDARAJU; ARULSELVI, 2018), sendo esse efeito mediado pela parada do ciclo celular na fase G0/G1 e indução de apoptose por via mitocondrial, juntamente com uma expressão reduzida da proteína anti-apoptótica Bcl-2 (GOVINDARAJU; ARULSELVI, 2018).

Por fim, no presente estudo, foi investigado se o OE-LM poderia alterar os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) celulares, uma vez que o aumento do estresse oxidativo aliado à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) representa um dos mecanismos de toxicidade apresentado por alguns quimioterápicos (VICTORINO et al., 2014; ZHU et al., 2020). De forma contraditória, as EROs desempenham papel crucial na sobrevivência, proliferação e migração de células tumorais, estando envolvidas em todas as etapas da carcinogênese, além de estarem envolvidas no processo de metástase. Portanto, a redução dos níveis de EROs podem modular negativamente esses processos levando a um efeito antiproliferativo (AGGARWAL et al., 2019; BABU; TAY, 2019).

Dessa forma, as terapias anticâncer podem seguir dois caminhos; usando compostos que previnem a formação de EROs e, assim, evitando a carcinogênese, proliferação, angiogênese e metástase; ou utilizando compostos que têm como mecanismo de ação o aumento de EROs, promovendo estresse oxidativo citotóxico para o tumor (DE-SÁ-JUNIOR et al., 2017; SAMPAIO et al., 2021). Assim, um bom equilíbrio de pró e antioxidantes celulares é necessário para permitir a proliferação e sobrevivência, particularmente em tumores como o melanoma, que encontram várias fontes de espécies reativas de oxigênio (EROs) (KREB et al., 2021).

Foi observado que o OE-LM diminuiu significativamente os níveis de EROs na linhagem SK-MEL-28, sugerindo que seu mecanismo de ação antitumoral *in vitro* envolve um potencial antioxidante.

Estudos mostram que a maioria das espécies do gênero *Lippia*, incluindo *L. microphylla*, cujos componentes majoritários são timol e carvacrol, apresentam atividade antioxidante (SINGULANI et al., 2011; SILVA, 2014; MERCES, 2011; MANESSIS et al., 2020). Nessa perspectiva, estudos indicam que a utilização de antioxidantes pode diminuir EROs intracelular e reduzir o risco do desenvolvimento e manutenção do câncer (GALADARI et al., 2017; HE et al., 2017). A literatura é vasta sobre os efeitos antioxidantes dos componentes fenólicos, em especial o timol, considerado como um dos componentes mais ativos na classe dos monoterpenos oxigenados (RANJBARAN et al., 2019; NASCIMENTO et al., 2021).

Para ratificar os resultados obtidos para o OE-LM, em uma revisão sistemática sobre o timol e o carvacrol, componentes majoritários do OE-LM, no período de 2003

a 2021, foi demonstrado que ambos são capazes de induzir apoptose, parada do ciclo celular, atividade antimetastática, e ainda apresentaram diferentes efeitos antiproliferativos somado à capacidade de inibir vias de sinalização (MAPKs e PI3K/AKT/mTOR) (SAMPAIO et al., 2021).

Então, os dados obtidos no presente estudo contribuem para elucidar a ação antitumoral do óleo essencial de *Lippia microphylla* em linhagem de células de melanoma humano e apontam os caminhos para estudos adicionais que investiguem as ações apoptótica e antioxidante do referido óleo.

Conclusões

7 CONCLUSÕES

Baseado nos ensaios realizados é possível concluir que o óleo essencial das folhas de *L. microphylla* (OE-LM) apresenta:

- Citotoxicidade para as células tumorais e não tumoral humanas avaliadas *in vitro*;
- Efeito antimelanoma em células da linhagem SK-MEL-28, com seletividade, em relação à linhagem não tumoral HaCaT, superior à droga padrão doxorubicina;
- Ação antitumoral na linhagem de melanoma SK-MEL-28 por interferir no ciclo celular, induzir apoptose e reduzir os níveis de EROs.

REFERÊNCIAS

- ABED, R.M. Cytotoxic, cytogenetics and immunomodulatory effects of thymol from *Thymus vulgaris* on cancer and normal cell lines in vitro and in vivo. **Al-Mustansiriyah J Sci**, v. 22, p. 41-53, 2011.
- ABENA, AA, DIATEWA, M., GAKOSSO, G., GBEASSOR, M., HONDI-ASSAH, TH, & OUAMBA, JM. Efeitos analgésicos, antipiréticos e antiinflamatórios do óleo essencial de *Lippia multiflora*. **Fitoterapia**, v. 74, n. 3, pág. 231-236, 2003.
- ABERS, M., SCHROEDER, S., GOELZ, L., SULSER, A., ROSE, T. S., PUCHALSKI, K., & Langland, J. Antimicrobial activity of the volatile substances from essential oils. **BMC complementary medicine and therapies**, v. 21, n. 1, p. 1-14, 2021.
- ABOTALEB, M. et al. Chemotherapeutic agents for the treatment of metastatic breast cancer: An update. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 101, n. February, p. 458–477, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.02.108>>.
- AGRA, M. D. F., BARACHO, G. S., NURIT, K., BASÍLIO, I. J. L. D., & COELHO, V. P. M. Medicinal and poisonous diversity of the flora of “Cariri Paraibano”, Brazil. **Journal of ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 383-395, 2007.
- AGUILAR, V.; FAJAS, L. Cycling through metabolism. **EMBO Molecular Medicine**, v. 2, n. 9, p. 338–348, 2010.
- AL-ABD, A. M., ALAMOUDI, A. J., ABDEL-NAIM, A. B., NEAMATALLAH, T. A., & ASHOUR, O. M. Anti-angiogenic agents for the treatment of solid tumors: Potential pathways, therapy and current strategies - A review. **Journal of Advanced Research**, v. 8, n. 6, p. 591–605, 2017.
- ALADARI, S. et al. Reactive oxygen species and cancer paradox: To promote or to suppress? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 104, n. August 2016, p. 144–164, 2017.
- ALEEM, E.; ARCECI, R. J. Targeting cell cycle regulators in hematologic malignancies. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 3, n. APR, p. 1–22, 2015.
- ALEEM, E.; KIYOKAWA, H.; KALDIS, Philipp. Cdc2–cyclin E complexes regulate the G1/S phase transition. **Nature cell biology**, v. 7, n. 8, p. 831-836, 2005.
- ALLEN, C.; HER, S.; JAFFRAY, D. A. Radiotherapy for Cancer: Present and Future. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 109, p. 1–2, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2017.01.004>>.
- ALMEIDA, V. L. D., LEITÃO, A., REINA, L. D. C. B., MONTANARI, C. A., DONNICI, C. L., & LOPES, M. T. P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118–129, 2005.
- AMARAL R.G. **ESTUDO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DO EXTRATO DAS FOLHAS DA *Passiflora alata* Curtis**. 2018. 159f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – UFSE, SERGIPE, 2018.

AMIRKIA, V.; HEINRICH, M. Natural products and drug discovery: a survey of stakeholders in industry and academia. **Frontiers in pharmacology**, v. 6, p. 237, 2015.

ANDRADE, M.A.; MARTINS, L. M. Novel Chemotherapeutic Agents-The Contribution of Scorpionates. **Current medicinal chemistry**, v. 26, n. 41, p. 7452-7475, 2019.

ANSARIZADEH, F.; SINGH, M.; RICHARDS, D. Modelling of tumor cells regression in response to chemotherapeutic treatment. **Applied mathematical modelling**, v. 48, p. 96-112, 2017.

ARAGHI, R. R., BIRD, G. H., RYAN, J. A., JENSON, J. M., GODES, M., PRITZ, J. R., ... & KEATING, A. E. Iterative optimization yields Mcl-1–targeting stapled peptides with selective cytotoxicity to Mcl-1–dependent cancer cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 5, p. E886-E895, 2018.

ARUNASREE, K. M. Anti-proliferative effects of carvacrol on a human metastatic breast cancer cell line, MDA-MB 231. **Phytomedicine**, v. 17, n. 8-9, p. 581-588, 2010.

AZZAM, EI, JAY-GERIN, JP, & PAIN, D. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. **Cancer letters**, v. 327, n. 1-2, p. 48-60, 2012.

BAGHDADI, H. H. Targeting Cancer Cells using 3 - bromopyruvate for Selective Cancer Treatment. **Saudi Journal of Medicine & Medical Sciences**, v. 5, p. 9–19, 2017.

BAHRAMI, B.; HOJJAT-FARSANGI, M.; MOHAMMADI, H.; ANVARI, E.; GHALAMFARSA, G.; YOUSEFI, M.; JADIDI-NIARAGH, F. Nanoparticles and targeted drug delivery in cancer therapy. **Immunology Letters**, v. 190, p. 64-83, 2017.

BAKHOUM, S. F.; LANDAU, D. A. Chromosomal instability as a driver of tumor heterogeneity and evolution. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 7, n. 6, p. a029611, 2017.

BALAN, D. J., RAJAVEL, T., DAS, M., SATHYA, S., JEYAKUMAR, M., & DEVI, K. P. Thymol induces mitochondrial pathway-mediated apoptosis via ROS generation, macromolecular damage and SOD diminution in A549 cells. **Pharmacological Reports**, v. 73, n. 1, p. 240-254, 2021.

BAX, B.D.; MURSHUDOV, G.; MAXWELL, A.; GERME, T. DNA Topoisomerase Inhibitors:Trapping a DNA-Cleaving Machine in Motion. **J. Mol. Biol.**, v. 431, p. 3427–3449, 2019.

BHALLA, Y., GUPTA, V. K., & JAITAK, V. Anticancer activity of essential oils: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 15, p. 3643-3653, 2013.

BHANDARY, B., MARAHATTA, A., KIM, H. R., & CHAE, H. J. An involvement of oxidative stress in endoplasmic reticulum stress and its associated diseases. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 1, p. 434-456, 2013.

- BHATTACHARYYA, A., CHATTOPADHYAY, R., MITRA, S., & CROWE, S. E. Oxidative stress: An essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. **Physiological Reviews**, v. 94, n. 2, p. 329–354, 2014.
- BILLEN, L. P.; SHAMAS-DIN, A.; ANDREWS, D. W. Bid: a Bax-like BH3 protein. **Oncogene**, v. 27, n. 1, p. S93-S104, 2008.
- BINDER, M., ROBERTS, C., NEAL SPENCER, D. A., & CARTWRIGHT, C. On the antiquity of cancer: Evidence for metastatic carcinoma in a young man from Ancient Nubia (c. 1200BC). **PloS one**, v. 9, n. 3, 2014.
- BLOCH, N.; HAREL, D. The tumor as an organ: comprehensive spatial and temporal modeling of the tumor and its microenvironment. **BMC Bioinformatics**, v. 17, n. 1, p. 317, 2016.
- BOSE, P., SIMMONS, G. L., & GRANT, S. Cyclin-dependent kinase inhibitor therapy for hematologic malignancies. **Expert opinion on investigational drugs**, v. 22, n. 6, p. 723-738, 2013.
- BOSE, S.; LE, A. Glucose Metabolism in Cancer. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1063, p. 3–12, 2018.
- BRAY, F., FERLAY, J., SOERJOMATARAM, I., SIEGEL, R. L., TORRE, L. A., & JEMAL, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018.
- BROWER, V. Cell cycle inhibitors make progress. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 106, n. 7, 2014.
- BUKOWSKI, K., KCIUK, M., & KONTEK, R. Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 9, p. 3233, 2020.
- CARNEIRO, B. A.; EL-DEIRY, W. S. Targeting apoptosis in cancer therapy. **Nature Reviews Clinical Oncology**, p. 1–23, 2020. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41571-020-0341-y>>.
- CARNEIRO, B. A.; EL-DEIRY, W. S. Targeting apoptosis in cancer therapy. **Nature reviews Clinical oncology**, v. 17, n. 7, p. 395-417, 2020.
- CASCALES, H. S.; MÜLLERS, E.; LINDQVIST, A. How the cell cycle enforces senescence. **Aging**, v. 9, n. 10, p. 2022–2023, 2017.
- CHAISSWING, L., ST. CLAIR, W. H., & ST. CLAIR, D. K. Redox Paradox: A novel approach to therapeutics-resistant cancer. **Antioxidants & redox signaling**, v. 29, n. 13, p. 1237-1272, 2018.
- CHAUHAN, A. K., BAHUGUNA, A., PAUL, S., & KANG, S. C. THYMOL ELICITS HCT-116 colorectal carcinoma cell death through induction of oxidative stress. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry- Anti-Cancer Agents)**, v. 17, n. 14, p. 1942-1950, 2017.
- CHESI, M., MIRZA, N. N., GARBITT, V. M., SHARIK, M. E., DUECK, A. C., ASMANN, Y. W., ... & KEANE, N. IAP antagonists induce anti-tumor immunity in multiple myeloma. **Nature medicine**, v. 22, n. 12, p. 1411, 2016.

Cimino, C., Maurel, O. M., Musumeci, T., Bonaccorso, A., Drago, F., Souto, E. M. B., ... & Carbone, C. Essential oils: pharmaceutical applications and encapsulation strategies into lipid-based delivery systems. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 3, p. 327, 2021.

CLEAL, K.; NORRIS, K.; BAIRD, D. Telomere Length Dynamics and the Evolution of Cancer Genome Architecture. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2, p. 482, 2018.

COCCIMIGLIO, J., ALIPOUR, M., JIANG, Z. H., GOTTARDO, C., & SUNTRES, Z. Antioxidant, antibacterial, and cytotoxic activities of the ethanolic *Origanum vulgare* extract and its major constituents. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2016, 2016.

Coletti, D. Chemotherapy-induced muscle wasting: an update. **European journal of translational myology**, v. 28, n. 2, 2018.

COSTA, SM, SANTOS, HS, PESSOA, OD, & LEMOS, TL. Constituintes do óleo essencial de *Lippia microphylla* Cham. do Nordeste do Brasil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 17, n. 4, pág. 378-379, 2005.

COSTA, SMO, LEMOS, TLG, PESSOA, ODL, PESSOA, C., MONTENEGRO, RC, & BRAZ-FILHO, R Chemical Constituents from *Lippia sidoides* and Cytotoxic Activity. **Journal of natural products**, v. 64, n. 6, p. 792-795, 2001.

CROMBIE, J.; LONGO, D.L. Principles of Cancer Treatment. In: HERRMANN, J. **Clinical Cardio-Oncology**. 1. ed. Amsterdam: Elsevier, p. 1 – 13, 2016.

CRUJEIRAS, A. B.; DE LORENZO, D. **Nutrients and gene expression in cancer**. [s.l.] Elsevier Inc., 2019. BLOCK, K. et al. A Broad-spectrum Integrative Prevention Design for Cancer Prevention and Therapy. **Seminars in Cancer Biology**, v. 35, n. Suppl, p. S276–S304, 2015.

D'ARCY, M. S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. **Cell Biology International**, v. 43, n. 6, p. 582–592, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/cbin.11137>>.

DAI, W. et al. Carvacrol suppresses proliferation and invasion in human oral squamous cell carcinoma. **OncoTargets and therapy**, v. 9, p. 2297, 2016.

DAI, X. et al. Cancer Hallmarks, Biomarkers and Breast Cancer Molecular Subtypes. **Journal of Cancer**, v. 7, n. 10, p. 1281–1294, 2016.

DARZYNKIEWICZ, Z.; BEDNER, E.; SMOLEWSKI, P. Flow cytometry in analysis of cell cycle and apoptosis. **Seminars in Hematology**, v. 38, n. 2, p. 179–193, 2001.

DAS, A., SARKAR, S., BHATTACHARYYA, S., & GANTAIT, S. Biotechnological advancements in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 104, n. 11, p. 4811-4835, 2020.

DAVID, J. P., MEIRA, M., DAVID, J. M., BRANDÃO, H. N., BRANCO, A., DE FÁTIMA AGRA, M., ... & GIULIETTI, A. M. Radical scavenging, antioxidant and cytotoxic activity of Brazilian Caatinga plants. **Fitoterapia**, v. 78, n. 3, p. 215-218, 2007

DAWE, D. E.; HARLOS, C. H.; JUERGENS, R. A. Immuno-oncology—the new paradigm of lung cancer treatment. **Current Oncology**, v. 27, n. Suppl 2, p. S78, 2020.

DE LA CHAPA, J. J., SINGHA, P. K., LEE, D. R., & GONZALES, C. B. Thymol inhibits oral squamous cell carcinoma growth via mitochondria-mediated apoptosis. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 47, n. 7, p. 674-682, 2018.

DE OLIVEIRA, P. F. et al. Cytotoxicity screening of essential oils in cancer cell lines. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 2, p. 183–188, 2015.

DE-SÁ-JUNIOR, P. L., CÂMARA, D. A. D., PORCACCHIA, A. S., FONSECA, P. M. M., JORGE, S. D., ARALDI, R. P., & FERREIRA, A. K. The roles of ROS in cancer heterogeneity and therapy. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2017, 2017.

DINIZ DO NASCIMENTO, L., MORAES, A. A. B. D., COSTA, K. S. D., PEREIRA GALÚCIO, J. M., TAUBE, P. S., COSTA, C. M. L., ... & FARIA, L. J. G. D. Bioactive natural compounds and antioxidant activity of essential oils from spice plants: new findings and potential applications. **Biomolecules**, v. 10, n. 7, p. 988, 2020.

DRĂGĂNESCU, M.; CARMOCAN, C. Review Article. Hormone Therapy in Breast Cancer. **Chirurgia**, v. 112, n. 4, p. 413–417, 2017.

EGGERSMANN, T. K. et al. CDK4/6 Inhibitors Expand the Therapeutic Options in Breast Cancer: Palbociclib, Ribociclib and Abemaciclib. **BioDrugs**, v. 33, n. 2, p. 125–135, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s40259-019-00337-6>>.

ELBE, H., YIGITTURK, G., CAVUSOGLU, T., UYANIKGIL, Y., & OZTURK, F. Apoptotic effects of thymol, a novel monoterpene phenol, on different types of cancer. **Bratislavske lekarske listy**, v. 121, n. 2, p. 122-128, 2020.

ELLIOTT, M. R.; RAVICHANDRAN, K. S. Clearance of apoptotic cells: implications in health and disease. **Journal of Cell Biology**, v. 189, n. 7, p. 1059-1070, 2010.

ELSHAFIE, H. S., ARMENTANO, M. F., CARMOSINO, M., BUFO, S. A., DE FEO, V., & CAMELE, I. Cytotoxic activity of *Origanum vulgare* L. on hepatocellular carcinoma cell line HepG2 and evaluation of its biological activity. **Molecules**, v. 22, n. 9, p. 1435, 2017.

ERNEI, T. et al. Synthesis, Structure and In Vitro Cytotoxic Activity of Novel Cinchona — Chalcone Hybrids with 1,4-Disubstituted- and 1,5-Disubstituted 1,2,3-Triazole Linkers. **Molecules**, v. 24, p. 4077, 2019.

ESKANDARI, Z., BAHADORI, F., CELIK, B., & ONYUKSEL, H. Targeted Nanomedicines for Cancer Therapy, From Basics to Clinical Trials. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 23, p. 132-157, 2020.

EVAN, G. I.; VOUSDEN, K. H. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. **Nature**, v. 411, n. 6835, p. 342–348, 2001.

FALCKE, S. E., RÜHLE, P. F., DELOCH, L., FIETKAU, R., FREY, B., & GAIPPL, U. S. Clinically relevant radiation exposure differentially impacts forms of cell death in human cells of the innate and adaptive immune system. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 11, p. 3574, 2018.

FEITELSON, M. A.; ARZUMANYAN, A.; KULATHINAL, R. J.; BLAIN, S. W.; HOLCOMBE, R. F.; MAHAJNA, J.; MARINO, M.; MARTINEZ-CHANTAR, M. L.; NAWROTH, R.; SANCHEZ-GARCIA, I.; SHARMA, D.; SAXENA, N. K.; SINGH, N.; VLACHOSTERGIOS, P. J.; GUO, S.; HONOKI, K.; FUJII, H.; GEORGAKILAS, A. G.; NOWSHEEN, S. Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets. **Seminars in Cancer Biology**. Amsterdam: Elsevier, p. S25-S54, 2015.

FEITELSON, M. A.; ARZUMANYAN, A.; KULATHINAL, R. J.; BLAIN, S. W.; HOLCOMBE, R. F.; MAHAJNA, J.; MARINO, M.; MARTINEZ-CHANTAR, M. L.; NAWROTH, R.; SANCHEZ-GARCIA, I.; SHARMA, D.; SAXENA, N. K.; SINGH, N.; VLACHOSTERGIOS, P. J.; GUO, S.; HONOKI, K.; FUJII, H.; GEORGAKILAS, A. G.; NOWSHEEN, S. Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets. **Seminars in Cancer Biology**. Amsterdam: Elsevier, p. S25-S54, 2015.

FERLAY J, ERVIK M, LAM F, COLOMBET M, MERY L, PIÑEROS M, et al. Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon: **International Agency for Research on Cancer**; 2020 (<https://gco.iarc.fr/today>, acesso em agosto de 2021).

FERLAY, J. et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. **International Journal of Cancer**, 2019.

FERNANDO, J; JONES, R. The principles of cancer treatment by chemotherapy. **Surgery-Oxford International Edition**, v. 33, n. 3, p. 131-135, 2015.

FERRAZ, R. P., BOMFIM, D. S., CARVALHO, N. C., SOARES, M. B., DA SILVA, T. B., MACHADO, W. J., ... & BEZERRA, D. P. Cytotoxic effect of leaf essential oil of *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae). **Phytomedicine**, v. 20, n. 7, p. 615-621, 2013.

FERREIRA, R. C., BATISTA, T. M., DUARTE, S. S., SILVA, D. K. F., LISBOA, T. M. H., CAVALCANTI, R. F. P., ... & SOBRAL, M. V. A novel piperine analogue exerts *in vivo* antitumor effect by inducing oxidative, antiangiogenic and immunomodulatory actions. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 128, n. May, p. 110247, 2020.

FERREIRA, R. C. **TOXICIDADE E AÇÃO ANTITUMORAL IN VIVO DO 4-(4-NITROBENZOATO)-PIPERINOATO DE BUTILA, UM NOVO DERIVADO DA PIPERINA**. 2019. 147 f. **Dissertação** (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – UFPB/CCS, João Pessoa.

FETT-NETO, A. G., DICOSMO, F. Production of paclitaxel and related taxoids in cell cultures of *Taxus cuspidata*: perspectives for industrial applications. In: **Plant Cell Culture Secondary Metabolism**. CRC Press, p. 139-166, 2020.

FISCHER, K., AL-SAWAF, O., BAHLO, J., FINK, A. M., TANDON, M., DIXON, M., ... & LIBERATI, A. M. Venetoclax and obinutuzumab in patients with CLL and coexisting conditions. **New England Journal of Medicine**, v. 380, n. 23, p. 2225-2236, 2019.

FITSIOU, E., MITROPOULOU, G., SPYRIDOPOULOU, K., VAMVAKIAS, M., BARDOUKI, H., GALANIS, A., ... & PAPPA, A. Chemical composition and evaluation of the biological properties of the essential oil of the dietary phytochemical *Lippia citriodora*. **Molecules**, v. 23, n. 1, p. 123, 2018.

FRANÇOIS C. Les Plantes et Leurs Noms Histoires Insolites. **QUAE**; Paris, França: 2012.

FRERES, P.; JERUSALEM, G.; MOONEN, M. Categories of Anticancer Treatments. In: LANCELLOTTI, P.; ZAMORANO J. L.; GALDERISI, M. **Anti-Cancer Treatments and Cardiotoxicity: Mechanisms, Diagnostic and Therapeutic Interventions**. Amsterdam: Elsevier, p. 7 – 11, 2017.

FULDA, S. Promises and challenges of Smac mimetics as cancer therapeutics. 2015.

GIACINTI, C.; GIORDANO, A. RB and cell cycle progression. **Oncogene**, v. 25, n. 38, p. 5220–5227, 2006.

GILL, J. G.; PISKOUNOVA, E.; MORRISON, S. J. Cancer, oxidative stress, and metastasis. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 81, n. 1, p. 163–175, 2016.

GIUSTARINI, D., COLOMBO, G., GARAVAGLIA, M. L., ASTORI, E., PORTINARO, N. M., REGGIANI, F., ... & MILZANI, A. Assessment of glutathione/glutathione disulphide ratio and S-glutathionylated proteins in human blood, solid tissues, and cultured cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 112, p. 360-375, 2017.

GOLDAR, S. et al. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 16, n. 6, p. 2129–2144, 2015.

GOMES, A. S.; RAMOS, H.; SOARES, J.; SARAIVA, L. p53 and glucose metabolism: an orchestra to be directed in cancer therapy. **Pharmacological Research**, 2018.

GONZÁLEZ-GUËRECA, M. C., SOTO-HERNANDEZ, M., & MARTINEZ-VAZQUEZ, M. Isolation of (–)(2S)-5, 6, 7, 3', 5'-pentahydroxyflavanone-7-O-β-D-glucopyranoside, from *Lippia graveolens* HBK var. *berlandieri* Schauer, a new anti-inflammatory and cytotoxic flavanone. **Natural product research**, v. 24, n. 16, p. 1528-1536, 2010.

GORRINI, C.; HARRIS, I. S.; MAK, T. W. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. **Nature reviews Drug discovery**, v. 12, n. 12, p. 931-947, 2013.

GOVINDARAJU, S.; ARULSELVI, P. Indra. Characterization of *Coleus aromaticus* essential oil and its major constituent carvacrol for in vitro antidiabetic and antiproliferative activities. **Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants**, v. 24, n. 1, p. 37-51, 2018.

GROEGER, G., QUINEY, C., & COTTER, T. G. Hydrogen peroxide as a cell-survival signaling molecule. **Antioxidants & redox signaling**, v. 11, n. 11, p. 2655-2671, 2009.

GUTSCHNER, T; DIEDERICHS, S. The hallmarks of cancer: a long non-coding RNA point of view. **RNA Biology**, v. 9, n. 6, p. 703-719, 2012.

HANAHAHAN, D. Rethinking the war on cancer. **The Lancet**, v. 383, n. 9916, p. 558–563, 2014.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HE, L., HE, T., FARRAR, S., JI, L., LIU, T., & MA, X. Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 44, n. 2, p. 532–553, 2017.

HEISTEIN JB, A. U. *StatPearls*. Publicação StatPearls; Treasure Island, FL, USA: 2020. Acesso em 11 de maio de 2021. Melanoma maligno. ID: NBK470409. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430685/>

HERRERO, A. B., ROJAS, E. A., MISIEWICZ-KRZEMINSKA, I., KRZEMINSKI, P., & GUTIÉRREZ, N. C. Molecular mechanisms of p53 deregulation in cancer: An overview in multiple myeloma. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 12, p. 2003, 2016.

HIGA, A. CHEVET, E. Redox signaling loops in the unfolded protein response. **Cellular signalling**, v. 24, n. 8, p. 1548-1555, 2012.

HINZ, Boris; LAGARES, David. Evasion of apoptosis by myofibroblasts: a hallmark of fibrotic diseases. **Nature Reviews Rheumatology**, p. 1-21, 2019.

HYNDMAN, I. J. Review : the Contribution of both Nature and Nurture to Carcinogenesis and Progression in Solid Tumours. **Cancer Microenvironment**, p. 63–69, 2016.

INCA. **Estimativa 2020 – Incidência de câncer no Brasil**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/noticias/brasil-tera-625-mil-novos-casos-de-cancer-cada-ano-do-trienio-2020-2022>>. Acesso em: 4 maio de 2020.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil**. INCA. Rio de Janeiro, 2020.

INFANTE L., L.; FENNER, S.; RATCLIFFE, S.; ISIDRO-LLOBET, A.; HANN, M.; BAX, B.; OSHEROFF, N. Coupling the core of the anticancer drug etoposide to an oligonucleotide induces topoisomerase II-mediated cleavage at specific DNA sequences. **Nucleic Acids Res**. v. 46, p. 2218–2233, 2018.

INGHAM, MA.; SCHWARTZ, G. K. Cell-cycle therapeutics come of age. **Journal of Clinical Oncology**, v. 35, n. 25, p. 2949, 2017.

ISRAELS, E. D.; L.G., I. S tem C ells. **STEM CELLS**, v. 19, p. 180–192, 2001.

INGHAM, M.; SCHWARTZ, G. K. Cell-cycle therapeutics come of age. **Journal of Clinical Oncology**, v. 35, n. 25, p. 2949–2959, 2017.

JAROSZ-BIEJ, M., SMOLARCZYK, R., CICHÓN, T., & KUŁACH, N. Tumor Microenvironment as A “Game Changer” in Cancer Radiotherapy. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 13, p. 3212, 2019.

JAYAT, C.; RATINAUD, M. H. Cell cycle analysis by flow cytometry: Principles and applications. **Biology of the Cell**, v. 78, n. 1–2, p. 15–25, 1993.

JIN, Z.; EL-DEIRY, W. S. Overview of cell death signaling pathways. **Cancer biology & therapy**, v. 4, n. 2, p. 147-171, 2005.

JING, X. et al. Role of hypoxia in cancer therapy by regulating the tumor microenvironment. **Molecular Cancer**, v. 18, n. 1, p. 1–15, 2019.

JULIÃO, S. A., RIBEIRO, C. D. V., LOPES, J. M. L., MATOS, E. M. D., REIS, A. C., PEIXOTO, P. H. P., ... & VICCINI, L. F. Induction of synthetic polyploids and assessment of genomic stability in *Lippia alba*. **Frontiers in plant science**, v. 11, p. 292, 2020.

KACZANOWSKI, S. Apoptosis: Its origin, history, maintenance and the medical implications for cancer and aging. **Physical Biology**, v. 13, n. 3, 2016.

KALKAVAN, H., GREEN, D. R. MOMP, cell suicide as a BCL-2 family business. **Cell Death & Differentiation**, v. 25, n. 1, p. 46-55, 2018.

KANG, H., ROSENWAKS, Z. p53 and reproduction. **Fertility and sterility**, v. 109, n. 1, p. 39-43, 2018.

KAR, S. Unraveling Cell-Cycle Dynamics in Cancer. **Cell Systems**, v. 2, n. 1, p. 8–10, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cels.2016.01.007>>.

KARPOZILOS, A.; PAVLIDIS, N. The treatment of cancer in Greek antiquity. **European journal of cancer**, v. 40, n. 14, p. 2033-2040, 2004.

KIGNEL, S. **Estomalogia Bases do diagnóstico para o clínico geral**. 2. ed. São Paulo: Editora Santos, 2013.

KIKUCHI, H.; YUAN, B.; HU, X.; Okazaki, M. Chemopreventive and anticancer activity of flavonoids and its possibility for clinical use by combining with conventional chemotherapeutic agents. **American journal of cancer research**, v. 9, n. 8, p. 1517, 2019.

KIM, J. H., LEE, S. Y., OH, S. Y., HAN, S. I., PARK, H. G., YOO, M., & KANG, H. S. Methyl jasmonate induces apoptosis through induction of Bax/Bcl-XS and activation of caspase-3 via ROS production in A549 cells. **Oncology reports**, v. 12, n. 6, p. 1233-1238, 2004.

KLAUNIG, J. E. Oxidative Stress and Cancer. **Current Pharmaceutical Design**, v. 24, n. 40, p. 4771–4778, 2019.

KOLLMANN, K. SEXL, V. CDK6 and p16INK4A in lymphoid malignancies. **Oncotarget**, v. 4, n. 11, p. 1858, 2013.

KREB, J. K. C., JESSEN, C., MARQUARDT, A., HUFNAGEL, A., & MEIERJOHANN, S. NRF2 Enables EGFR Signaling in Melanoma Cells. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 8, p. 3803, 2021.

KUMAR, A.; SASMAL, D.; SHARMA, N. Immunomodulatory role of piperine in deltamethrin induced thymic apoptosis and altered immune functions. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 39, n. 2, p. 504-514, 2015.

KUMAR, D.; SHARMA, S.; VERMA, S.; KUMAR, P.; AMBASTA, R. K. Molecular signalling saga in tumour biology. **Journal of Tumor**, v. 3, n. 2, p. 309-313, 2015.

KUMAR, R.; KAUR, M.; KUMARI, M. Acridine: A versatile heterocyclic nucleus. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, v. 69, n. 1, p. 3–9, 2012.

KUMAR, S.; BAJAJ, S.; BODLA, R. Preclinical screening methods in cancer. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 48, n. 5, p. 481–486, 2016.

KUPSCO, A.; SCHLENK, D. Oxidative stress, unfolded protein response, and apoptosis in developmental toxicity. In: **International review of cell and molecular biology**. Academic Press, 2015. p. 1-66.

KUPSCO, A.; SCHLENK, D. Oxidative Stress, Unfolded Protein Response, and Apoptosis in Developmental Toxicity. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 1, p. 139–148, 2016.

LAKHANI, C. M. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 3, p. 139–148, 2019.

LE, T.; BHUSHAN, V.; SOCHAT, M.; CHAVDA, Y. First Aid for the USMLE Step 1, 1st ed.; **McGraw-Hill Education**: New York, NY, USA, p. 416–419, 2017.

LEE, K. P., KIM, J. E., PARK, W. H., & HONG, H. Regulation of C6 glioma cell migration by thymol. **Oncology letters**, v. 11, n. 4, p. 2619-2624, 2016.

LEE, Y. T.; TAN, Y. J.; OON, C. E. Molecular targeted therapy: Treating cancer with specificity. **European Journal of Pharmacology**, v. 834, p. 188–196, 2018.
Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.07.034>>.

LI, H. T. DUYMICH, C. E., WEISENBERGER, D. J., LIANG, G. **Genetic and epigenetic alterations in bladder cancer**. Sixth Edition ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2016. v. 20

LI, H. T. **Genetic and epigenetic alterations in bladder cancer**. Sixth Edition ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2016. v. 20

LI, L., HE, L., WU, Y., & ZHANG, Y. Carvacrol affects breast cancer cells through TRPM7 mediated cell cycle regulation. **Life sciences**, v. 266, p. 118894, 2021.

LICHOTA, A.; GWOZDZINSKI, K. Anticancer Activity of Natural Compounds from Plant and Marine Environment. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 11, p. 3533, 2018.

LIGUORI, I.; RUSSO, G.; CURCIO, F.; BULLI, G.; ARAN, L.; DELLA-MORTE, D.; ABETE, P. Oxidative stress, aging, and diseases. **Clinical Interventions in Aging**, v. 13, p. 757–772, 2018.

LIM, S., KALDIS, P. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. **Development**, v. 140, n. 15, p. 3079-3093, 2013.

LIU, G. STORZ, P. Reactive oxygen species in cancer. **Free radical research**, v. 44, n. 5, p. 479-496, 2010.

LIU, X., FAN, L., LU, C., YIN, S., & HU, H. Functional Role of p53 in the Regulation of Chemical-Induced Oxidative Stress. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2020, p. 6039769, 2020.

LIU, Y.; YIN, T.; FENG, Y.; CONA, M. M.; HUANG, G.; LIU, J.; SONG, S.; JIANG, Y.; XIA, Q.; SWINNEN, J. V.; BORMANS, G.; HIMMELREICH, U.;

LLANA-RUIZ-CABELLO, M., Gutiérrez-Praena, D., Pichardo, S., Moreno, F. J., Bermúdez, J. M., Aucejo, S., & Cameán, A. M. Cytotoxicity and morphological effects

induced by carvacrol and thymol on the human cell line Caco-2. **Food and Chemical Toxicology**, v. 64, p. 281-290, 2014.

LOAN, N. T. B., TRUNG, N. N., LE NA, N. T., & THANG, N. D. Anticancer activities of ricin-liposome complexes on SKMEL-28 cells. **Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP**, v. 20, n. 7, p. 2117, 2019.

LORENZI H, MATOS FJA. **Medicinal Plants in Brazil: Natives e Exotics**. Nova Odessa, p. 1-512, 2002

LUO, Y., WU, J. Y., LU, M. H., SHI, Z., NA, N., & DI, J. M. Carvacrol alleviates prostate cancer cell proliferation, migration, and invasion through regulation of PI3K/Akt and MAPK signaling pathways. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2016, 2016.

MACHERET, M; HALAZONETIS, T. D. DNA replication stress as a hallmark of cancer. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 10, p. 425-448, 2015.

MACHERET, M; HALAZONETIS, T. D. DNA replication stress as a hallmark of cancer. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 10, p. 425-448, 2015.

MAJTNEROVÁ, P.; ROUŠAR, T. An overview of apoptosis assays detecting DNA fragmentation. **Molecular Biology Reports**, v. 45, n. 5, p. 1469–1478, 2018.

malignancies exploitable for imaging-based preclinical theragnostic research. **Quantitative Imaging in Medicine and Surgery**, v. 5, n. 5, p. 708, 2015.

MALUMBRES, M. kinases C-dependent. **Cyclin-dependent kinases. Genome Biol**, v. 15, p. 122, 2014.

MANESSIS G, KALOGIANNI AI, LAZOU T, MOSCHOVAS M, BOSSIS I, GELASAKIS AI. Plant-Derived Natural Antioxidants in Meat and Meat Products. **Antioxidants** vol 9, n.12, p. 1215, 2020. doi: 10.3390/antiox9121215.

MANGUEIRA, V. M. **EFEITOS ANTITUMORAL E ANTINOCICEPTIVO DE UM NOVO DERIVADO ACRIDÍNICO**. 2019. 147f. **Tese** (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – UFPB/CCS, João Pessoa, 2019.

MARCHI, E.; O'CONNOR, O.A. Safety and efficacy of pralatrexate in the treatment of patients with relapsed or refractory peripheral T-cell lymphoma. **Ther. Adv. Hematol.** v. 3, p. 227–235, 2012.

MARI, A., MANI, G., NAGABHISHEK, S. N., BALARAMAN, G., SUBRAMANIAN, N., MIRZA, F. B., ... & THIRUVENGADAM, D. Carvacrol promotes cell cycle arrest and apoptosis through PI3K/AKT signaling pathway in MCF-7 breast cancer cells. **Chinese journal of integrative medicine**, p. 1-8, 2020.

MARTINVALET, D., ZHU, P., & LIEBERMAN, J. Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. **Immunity**, v. 22, n. 3, p. 355-370, 2005.

MEHDI, S. J., AHMAD, A., IRSHAD, M., MANZOOR, N., & RIZVI, M. M. A. Cytotoxic effect of Carvacrol on human cervical cancer cells. **Biol Med**, v. 3, n. 2, p. 307-312, 2011.

MELUŠOVÁ, M., JANTOVÁ, S., & HORVÁTHOVÁ, E. Carvacrol and rosemary oil at higher concentrations induce apoptosis in human hepatoma HepG2 cells. **Interdisciplinary toxicology**, v. 7, n. 4, p. 189, 2014.

MERCÊS, M. D. D. Potencial antimicrobiano e atividade antioxidante de espécies do gênero *Lippia* (Verbenaceae) do semi-árido baiano. 2011. 69f. Dissertação. Tese (Mestrado em Biotecnologia) Bahia, 2011.

MILLER, K. D., NOGUEIRA, L., MARIOTTO, A. B., ROWLAND, J. H., YABROFF, K. R., ALFANO, C. M., ... & SIEGEL, R. L. Cancer treatment and survivorship statistics, 2019. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 69, n. 5, p. 363-385, 2019.

MILLER, K. D.; SIEGEL, R. L.; LIN, C. C.; MARIOTTO, A. B.; KRAMER, J. L.; ROWLAND, J. H.; STEIN, K. D.; ALTERI, R.; JEMAL, A. Cancer treatment and survivorship statistics. **CA: a Cancer Journal for Clinicians**, v. 66, n. 4, p. 271-289, 2016.

MILLS, C. C.; KOLB, E.; SAMPSON, V. B. Development of chemotherapy with cell cycle inhibitors for adult and pediatric cancer therapy. **Cancer Research**, v. 78, n. 2, p. 320–325, 2018.

MINTIE, C. A.; SINGH, C. K.; AHMAD, N. Whole Fruit Phytochemicals Combating Skin Damage and Carcinogenesis. **Translational Oncology**, v. 13, n. 2, p. 146–156, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tranon.2019.10.014>>.

MOLEJON, M. I. et al. Glycoconjugation: An approach to cancer therapeutics. **World Journal of Clinical Oncology**, v. 11, n. 3, p. 110–120, 2020.

MOLONEY, J. N.; COTTER, T. G. ROS signalling in the biology of cancer. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 80, p. 50–64, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.05.023>>.

MOON, D. O., KIM, M. O., CHOI, Y. H., HYUN, J. W., CHANG, W. Y., & KIM, G. Y. Butein induces G2/M phase arrest and apoptosis in human hepatoma cancer cells through ROS generation. **Cancer letters**, v. 288, n. 2, p. 204-213, 2010.

MORAIS, R. S., OLIVEIRA, S. L. T., BARA, F. T. M., CONCEIÇÃO, C. E., REZENDE, FERRI, H. P., PAULA, R. J. **Chemical constituents of essential oil from *Lippia sidoides* Cham (Verbenaceae) leaves cultivated in Hidrolândia, Goiás, Brasil.** Pag 4, 2012.

MORENO, É. M., LEAL, S. M., STASHENKO, E. E., & GARCÍA, L. T. Induction of programmed cell death in *Trypanosoma cruzi* by *Lippia alba* essential oils and their major and synergistic terpenes (citral, limonene and caryophyllene oxide). **BMC complementary and alternative medicine**, v. 18, n. 1, p. 1-16, 2018.

MORRIS, L. G. T.; CHAN, T. A. Therapeutic Targeting of Tumor Suppressor Genes. **Cancer**, v. 121, n. 9, p. 1357–1368, 2015.

MOSCA, L., ILARI, A., FAZI, F., ASSARAF, Y. G., & COLOTTI, G. Taxanes in cancer treatment: Activity, chemoresistance and its overcoming. **Drug Resistance Updates**, v. 54, p. 100742, 2021.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, p. 55–63, 1983.

MOURA, A. P. G., BELTRÃO, D. M., PITA, J. C. L. R., XAVIER, A. L., BRITO, M. T., SOUSA, T. K. G. D., ... & SOBRAL, M. V. Essential oil from fruit of *Xylopia langsdorffiana*: antitumour activity and toxicity. **Pharmaceutical biology**, v. 54, n. 12, p. 3093-3102, 2016.

MUKHOPADHYAY, S. et al. Autophagy and apoptosis: Where do they meet? **Apoptosis**, v. 19, n. 4, p. 555–566, 2014.

NAGATA, S.; TANAKA, M. Programmed cell death and the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 5, p. 333–340, 2017.

NASCIMENTO, L., SILVA, S. G., CASCAES, M. M., COSTA, K., FIGUEIREDO, P., COSTA, C., ANDRADE, E., & DE FARIA, L. Drying Effects on Chemical Composition and Antioxidant Activity of *Lippia thymoides* Essential Oil, a Natural Source of Thymol. **Molecules (Basel, Switzerland)**, vol 26, n.9, 2021.
<https://doi.org/10.3390/molecules26092621>

NEGANOVA, I., VILELLA, F., ATKINSON, S. P., LLORET, M., PASSOS, J. F., VON ZGLINICKI, T., ... & LAKO, M. An important role for CDK2 in G1 to S checkpoint activation and DNA damage response in human embryonic stem cells. **Stem Cells**, v. 29, n. 4, p. 651-659, 2011.

NENCLARES, P.; HARRINGTON, K. J. The biology of cancer. **Medicine (United Kingdom)**, v. 48, n. 2, p. 67–72, 2020. Disponível em:
<<https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2019.11.001>>.

NICOLINI, A., CARPI, A., FERRARI, P., MARIO BIAVA, P., & ROSSI, G. Immunotherapy and Hormone-therapy in Metastatic Breast Cancer: A Review and an Update. **Current Drug Targets**, v. 17, n. 10, p. 1127–1139, 2016.

NIJHAWAN, D., FANG, M., TRAER, E., ZHONG, Q., GAO, W., DU, F., & WANG, X. Elimination of Mcl-1 is required for the initiation of apoptosis following ultraviolet irradiation. **Genes & development**, v. 17, n. 12, p. 1475-1486, 2003.

NUSSBAUMER, S.; BONNABRY, P.; VEUTHEY, J.L.; FLEURY-SOUVERAIN, S. Analysis of anticancer drugs: A review. **Talanta**, n. 85, p. 2265–2289, 2011.

ODES, E. J., RANDOLPH-QUINNEY, P. S., STEYN, M., THROCKMORTON, Z., SMILG, J. S., ZIPFEL, B., ... & BERGER, L. R. Earliest hominin cancer: 1.7-million-year-old osteosarcoma from Swartkrans Cave, South Africa. **South African Journal of Science**, v. 112, n. 7-8, p. 1-5, 2016.

O'LEARY, N., CALVIÑO, CI, MARTÍNEZ, S., LU - IRVING, P., OLMSTEAD, RG, & MÚLGURA, ME. Evolução de características morfológicas em Verbenaceae. **American Journal of Botany** , v. 99, n. 11, pág. 1778-1792, 2012.

OTTO, T.; SICINSKI, P. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 17, n. 2, p. 93–115, 2017.

ÖZKAN, Aysun; ERDOĞAN, Ayşe. A comparative evaluation of antioxidant and anticancer activity of essential oil from *Origanum onites* (Lamiaceae) and its two major phenolic components. **Turkish Journal of Biology**, v. 35, n. 6, p. 735-742, 2011.

PAKDEMIRLI, A., KARACA, C., SEVER, T., DAŞKIN, E., LEBLEBICI, A., YIĞITBAŞI, T., & BAŞBINAR, Y. Carvacrol alters soluble factors in HCT-116 and HT-29 cell lines. **Turkish journal of medical sciences**, v. 50, n. 1, p. 271-276, 2020.

PANIERI, E.; SANTORO, M. M. ROS homeostasis and metabolism: a dangerous liason in cancer cells. **Cell death & disease**, v. 7, n. 6, p. e2253-e2253, 2016.

PÁRAL, P., FALTUSOVÁ, K., MOLÍK, M., RENEŠOVÁ, N., ŠEFC, L., & NEČAS, E. Cell cycle and differentiation of Sca-1+ and Sca-1– hematopoietic stem and progenitor cells. **Cell Cycle**, v. 17, n. 16, p. 1979–1991, 2018.

PARK, S.-Y.; NAM, J.-S. The force awakens: metastatic dormant cancer cells. **Experimental & Molecular Medicine**, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s12276-020-0423-z>>.

Pathania, A. S., Prathipati, P., Abdul, B. A., Chava, S., Katta, S. S., Gupta, S. C., ... & Challagundla, K. B. COVID-19 and cancer comorbidity: therapeutic opportunities and challenges. **Theranostics**, v. 11, n. 2, p. 731, 2021.

PATTERSON, A. D., GONZALEZ F.J, PERDEW G.H., PETER J.M.. Molecular Regulation of Carcinogenesis: Friend and Foe. **Toxicological Sciences**, v. 165, n. 2, p. 277–283, 2018.

PEIXOTO, M. G., COSTA-JÚNIOR, L. M., BLANK, A. F., DA SILVA LIMA, A., MENEZES, T. S. A., DE ALEXANDRIA SANTOS, D., ARRIGONI-BLANK M. Acaricidal activity of essential oils from *Lippia alba* genotypes and its major components carvone, limonene, and citral against *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary parasitology**, v. 210, n. 1-2, p. 118-122, 2015.

PENG, X.; LI, L.; REN, Y.; XUE, H.; LIU, H.; WEN, S.; CHEN, J. Synthesis of N-Carbonyl Acridanes as Highly Potent Inhibitors of Tubulin Polymerization via One-Pot Copper-Catalyzed Dual Arylation of Nitriles with Cyclic Diphenyl Iodoniums **Advanced Synthesis & Catalysis**. p. 1-7, 2020.

PERNAS, S. et al. CDK4/6 inhibition in breast cancer: current practice and future directions. **Therapeutic advances in medical oncology**, v. 10, p. 1758835918786451, 2018.

PERSSON, T.; POPESCU, B. O.; CEDAZO-MINGUEZ, A. Oxidative stress in Alzheimer's disease: why did antioxidant therapy fail?. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, 2014.

PETERS, J. M.; GONZALEZ, Frank J. The Evolution of Carcinogenesis. **Toxicological Sciences**, v. 165, n. 2, p. 272-276, 2018.

PETRELLI, F. et al. Comparative efficacy of palbociclib, ribociclib and abemaciclib for ER+ metastatic breast cancer: an adjusted indirect analysis of randomized controlled trials. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 174, n. 3, p. 597–604, 2019.

PETRELLI, F. et al. Comparative efficacy of palbociclib, ribociclib and abemaciclib for ER+ metastatic breast cancer: an adjusted indirect analysis of randomized controlled trials. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 174, n. 3, p. 597–604, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10549-019-05133-y>>.

PFEFFER, C. M.; SINGH, A. T. K. Apoptosis: A target for anticancer therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2, 2018.

PILON, A. et al. A new family of iron(II)-cyclopentadienyl compounds shows strong activity against colorectal and triple negative breast cancer cells. **Molecules**, v. 25, n. 7, 2020.

PING, Z. et al. Oxidative Stress in Radiation-Induced Cardiotoxicity. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2020, p. 3579143, 2020.

PISTRITTO, G., TRISCIUOGGIO, D., CECI, C., GARUFI, A., & D'ORAZI, G. Apoptosis as anticancer mechanism: Function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. **Aging**, v. 8, n. 4, p. 603–619, 2016.

POLK, A. et al. Specific CDK4/6 inhibition in breast cancer: A systematic review of current clinical evidence. **ESMO Open**, v. 1, n. 6, p. 1–11, 2016.

POLO, M. DE L. H.; ELIZABETH, D.; REJ, B.; et al. Surgical considerations when reporting MRI studies of soft tissue sarcoma of the limbs. **Skeletal Radiology**, v. 46, p. 1667-1678, 2017.

POON, I. K., LUCAS, C. D., ROSSI, A. G., & RAVICHANDRAN, K. S. Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. **Nature reviews Immunology**, v. 14, n. 3, p. 166-180, 2014.

PORATTI, M.; MARZARO, G. Third-generation CDK inhibitors: A review on the synthesis and binding modes of Palbociclib, Ribociclib and Abemaciclib. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 172, p. 143–153, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.03.064>>.

RAHMAN, M et al. Adult Immuno-Oncology: Using Past Failures to Inform the Future. **European neuropsychopharmacology: the journal of the European College of Neuropsychopharmacology**, v. 26, n. 6, p. 1–15, 2020.

RANJBARAN, A., KAVOOSI, G., MOJALLAL-TABATABAEI, Z., & ARDESTANI, S. K. The antioxidant activity of Trachyspermum ammi essential oil and thymol in murine macrophages. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 20, p. 101220, 2019.

RECZEK, COLLEEN R.; CHANDEL, NAVDEEP S. The two faces of reactive oxygen species in cancer. **Annual Review of Cancer Biology**, 2017.

REN, S.; ROLLINS, B. J. Cyclin C/cdk3 promotes Rb-dependent G0 exit. **Cell**, v. 117, n. 2, p. 239-251, 2004.

RENVOIZÉ, C. et al. Apoptosis: Identification of dying cells. **Cell Biology and Toxicology**, v. 14, n. 2, p. 111–120, 1998.

RICCARDI, C.; NICOLETTI, I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1458–1461, 2006.

RICCARDI, C.; NICOLETTI, I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1458–1461, 2006.

ROACH, Brett Lee et al. Identification and characterization of a novel phosphoregulatory site on cyclin-dependent kinase 5. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 504, n. 4, p. 753-758, 2018.

ROBERTS, A. W., DAVIDS, M. S., PAGEL, J. M., KAHL, B. S., PUVVADA, S. D., GERECITANO, J. F., ... & WONG, S. Targeting BCL2 with venetoclax in relapsed

chronic lymphocytic leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 4, p. 311-322, 2016.

ROBERTS, P. J., BISI, J. E., STRUM, J. C., COMBEST, A. J., DARR, D. B., USARY, J. E., ... & SHARPLESS, N. E. Multiple roles of cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitors in cancer therapy. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 104, n. 6, p. 476-487, 2012.

ROBERTSON, J. L., JONES, M. M., OLGUIN, E., ALBERTS, B. **Bioassays with arthropods**. CRC press, 2017.

ROMIEU, I., AMADOU, A., CHAJES, V. The role of diet, physical activity, body fatness, and breastfeeding in breast cancer in young women: epidemiological evidence. **Revista de Investigacion Clinica**, v. 69, n. 4, p. 193-203, 2017.

RYGIEL, T. P., MERTENS, A. E., STRUMANE, K., VAN DER KAMMEN, R., & COLLARD, J. G. The Rac activator Tiam1 prevents keratinocyte apoptosis by controlling ROS-mediated ERK phosphorylation. **Journal of cell science**, v. 121, n. 8, p. 1183-1192, 2008.

SABHARWAL, S. S., & SCHUMACKER, P. T. Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel?. **Nature Reviews Cancer**, v. 14, n. 11, p. 709-721, 2014.

SAILO, B. L. et al. Tocotrienols: The promising analogues of vitamin E for cancer therapeutics. **Pharmacological Research**, v. 130, p. 259–272, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.02.017>>.

SAMBA, N., AITFELLA-LAHLOU, R., NELO, M., SILVA, L., ROCHA, P., & LÓPEZ RODILLA, J. M. Chemical Composition and Antibacterial Activity of *Lippia multiflora* Moldenke Essential Oil from Different Regions of Angola. **Molecules**, v. 26, n. 1, p. 155, 2021.

SAMPAIO, LA, PINA, LTS, SERAFINI, MR, DOS SANTOS TAVARES, D., & GUIMARÃES, AG. SAMPAIO, Laeza Alves et al. Antitumor effects of carvacrol and thymol: A systematic review. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, 2021.

ŞANLI, Arif; KARADOĞAN, T. Geographical impact on essential oil composition of endemic *Kundmannia anatolica* Hub.-Mor.(Apiaceae). **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 14, n. 1, p. 131-137, 2017.

SANTOS HS, COSTA SM, PESSOA OD, MORAES MO, PESSOA C, FORTIER S. Cytotoxic naphthoquinones from roots of *Lippia microphylla*. **Z Naturforsch C**, v.58, p. 517-20, 2003.

SANTOS HS, SILVEIRA ER, COSTA SM, LEMOS TL, PESSOA OD, UCHOA DE. ¹H and ¹³C NMR application to structure elucidations of prenylated naphthoquinone dimers from *Lippia microphylla*. An **Ressonância Magn Nucl** v.1, p.32-6, 2002

SANTOS, H. S., COSTA, S. M., PESSOA, O. D., MORAES, M. O., PESSOA, C., FORTIER, S., ... & LEMOS, T. L. Cytotoxic naphthoquinones from roots of *Lippia microphylla*. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 58, n. 7-8, p. 517-520, 2003.

SANTOS, H. S., LEMOS, T. L. G., PESSOA, O. D. L., COSTA, S. M. O., DE ANDRADE UCHÔA, D. E., & SILVEIRA, E. R. ¹H and ¹³C NMR Application to

Structure Elucidation of Prenylated Naphthoquinone Dimers from *Lippia microphylla*. 2002.

SANTOS, HS, COSTA, SM, PESSOA, OD, MORAES, MO, PESSOA, C., FORTIER, S., ... & LEMOS, TL. Naftoquinonas citotóxicas de raízes de *Lippia microphylla*. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 58, n. 7-8, pág. 517-520, 2003.

SANTOS, J. et al. Th1-Biased Immunomodulation and *In Vivo* Antitumor Effect of a Novel Piperine Analogue. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 9, p. 1–22, 2018.

SANTOS, J. S. D., MELO, J. I. M. D., ABREU, M. C. D., & SALES, M. F. D. Verbenaceae sensu stricto na região de Xingó: Alagoas e Sergipe, Brasil. **Rodriguésia**, v. 60, n. 4, p. 985-998, 2009.

SARASTE, A.; PULKKI, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovascular Research**, v. 45, n. 3, p. 528–537, 2000.

SARSOUR, E. H., VENKATARAMAN, S., KALEN, A. L., OBERLEY, L. W., & GOSWAMI, P. C. Manganese superoxide dismutase activity regulates transitions between quiescent and proliferative growth. **Aging cell**, v. 7, n. 3, p. 405-417, 2008.

SATOOKA, Hiroki; KUBO, Isao. Effects of thymol on B16-F10 melanoma cells. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 10, p. 2746-2752, 2012.

SATYANARAYANA, A. KALDIS, Philipp. A dual role of Cdk2 in DNA damage response. **Cell division**, v. 4, n. 1, p. 9, 2009.

SCHEICHER, R., HOELBL-KOVACIC, A., BELLUTTI, F., TIGAN, A. S., PRCHAL-MURPHY, M., HELLER, G., ... & MALUMBRES, M. CDK6 as a key regulator of hematopoietic and leukemic stem cell activation. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 125, n. 1, p. 90-101, 2015.

SCHRADER, M., & FAHIMI, H. D. Peroxisomes and oxidative stress. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1763, n. 12, p. 1755-1766, 2006.

SERAFIM, V. L. Síntese, elucidação estrutural e avaliação biológica de potenciais fármacos antitumorais e antimaláricos de derivados acilidrazônicos-acridínicos. **Trabalho de conclusão de curso. Universidade Estadual da Paraíba**, p. 81, 2014.

SHALAPOUR, S.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer: an eternal fight between good and evil. **The journal of clinical investigation**, v. 125, n. 9, p. 3347–3355, 2015.

SHAPIRO, G., ROSEN, L. S., TOLCHER, A. W., GOLDMAN, J. W., GANDHI, L., PAPADOPOULOS, K. P., ... & LI, Q. A first-in-human phase I study of the CDK4/6 inhibitor, LY2835219, for patients with advanced cancer. 2013

Sharifi-Rad, J., Sureda, A., Tenore, G. C., Daglia, M., Sharifi-Rad, M., Valussi, M., ... & Iriti, M. Biological activities of essential oils: From plant chemoecology to traditional healing systems. **Molecules**, v. 22, n. 1, p. 70, 2017.

SHARMA, B; DHAMIJA, I.; KUMAR, S.; CHAUDHARY, H. *In vitro* and *in vivo* evaluation of antitumor activity of methanolic extract of *Argyrea nervosa* leaves on

Ehrlich ascites carcinoma. **Bangladesh Journal of Pharmacology**, v. 10, n. 2, p. 399-408, 2015.

SHARMEEN, J. B., MAHOMOODALLY, F. M., ZENGİN, G., & MAGGI, F. Essential oils as natural sources of fragrance compounds for cosmetics and cosmeceuticals. **Molecules**, v. 26, n. 3, p. 666, 2021.

SHERR, B. C. J.; FOOD, U. S. Complexes Reveal the Mechanism of Drug Inhibition. v. 366, n. 647, 2019. BEAGRİE, R. A.; POMBO, A. Cell cycle: Continuous chromatin changes. **Nature**, v. 547, n. 7661, p. 34–35, 2017.

SHERR, C.J.; BARTEK, J. Cell cycle – Targeted Cancer Therapies. **Annual Review of Cancer Biology**, v. 1, p. 41-57, 2017.

SHIELDS, M. Chemotherapeutics. In: MCCREATH, S.B.; DELGODA, R. Pharmacognosy: **Fundamentals, Applications and Strategies**. Amsterdam: Elsevier, p. 295 – 313, 2017.

SILVA, D. K. F. Efeito antitumoral e toxicidade de um novo derivado acridínico (AMTAC-17) em modelos *in vitro* e *in vivo*. **Tese de Doutorado. Universidade Federal da Paraíba**, p. 183, 2020.

SILVA, D. K. F. **Efeito antitumoral e toxicidade do (e)-5'-oxo-1'-((3,4,5-trimetoxi-benzilideno) amino)-1', 5'-dihidro-10*h*-espiro [acridina-9,2'-pirrol]- 4'-carbonitrila (amtac-17)**. 2020. 177p. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – UFPB/ CCS, João Pessoa.

SILVA, D. K. F. Efeito antitumoral e toxicidade do (E)-5'-oxo-1'-((3,4,5-trimetoxi-benzilideno) amino)-1', 5'-dihidro-10*H*-espiro [acridina-9,2'-pirrol]- 4'-carbonitrila (AMTAC-17). 2020. 177p. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – UFPB/ CCS, João Pessoa.

SILVA, D. K. F. et al. Antitumor Effect of a Novel Spiro-Acridine Compound is Associated with Up-Regulation of Th1-Type Responses and Antiangiogenic Action. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 25, n. 1, p. 1–9, 2019.

SILVA, M. C. C. **Óleo essencial de *Lippia microphylla* Cham. (Verbenaceae) modula a via do óxido nítrico para exercer efeito tocolítico em rata**. 2020. 134p. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – UFPB/ CCS, João Pessoa.

SILVA, M. D. C. C., SOUZA, I. L. L. D., VASCONCELOS, L. H. C., FERREIRA, P. B., ARAUJO, L. C. D. C., SAMPAIO, R. D. S., ... & CAVALCANTE, F. D. A. Essential oil from *Lippia microphylla* Cham. modulates nitric oxide pathway and calcium influx to exert a tocolytic effect in rat uterus. **Natural product research**, p. 1-6, 2019.

SILVA, M. D. D. Estudo da composição química de óleo essencial de *L. microphylla* CHAM. Em três anos diferentes e atividade antioxidante. 2011. 69f. Dissertação. Tese (Mestrado em química) – Roraima, 2014.

SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., DE MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A., & PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Artmed Editora, 2016.

SIMÕES, E. R. B., SANTOS, E. A., DE ABREU, M. C., DO NASCIMENTO SILVA, J., NUNES, N. M. F., DA COSTA, M. P., ... & FERREIRA, P. M. P. Biomedical

properties and potentiality of *Lippia microphylla* Cham. and its essential oils. **Journal of intercultural ethnopharmacology**, v. 4, n. 3, p. 256, 2015.

SIVIERO, F. **Biologia celular: bases moleculares e metodologia de pesquisa**. 1 ed. – São Paulo: Roca, 2013.

SMITH, S; PREWETT, S. Principles of chemotherapy and radiotherapy. **Obstetrics, Gynaecology and Reproductive Medicine**, v. 27, n. 7, p. 206-212, 2017.

SOMMA, S. DI et al. G-Quadruplex Binders Induce Immunogenic Cell Death Markers in Aggressive Breast Cancer Cells. **Cancers**, v. 11, p. 1797, 2019.

SORO, L. C. **Caractérisation biochimique et activités biologiques des feuilles de *Lippia multiflora* Verbenaceae" théier de savane" cultivé en milieux forestier et savanicole de Côte d'Ivoire**. 2016. Tese de Doutorado. UNA [Université Nangui Abrogoua].

SPYRIDOPOULOU, K., ARAVIDOU, T., LAMPRI, E., EFFRAIMIDOU, E., PAPPA, A., & CHLICHIA, K. Antitumor Potential of *Lippia citriodora* Essential Oil in Breast Tumor-Bearing Mice. **Antioxidants**, v. 10, n. 6, p. 875, 2021

SPYRIDOPOULOU, K., FITSIOU, E., BOULOUKOSTA, E., TIPTIRI-KOURPETI, A., VAMVAKIAS, M., OREOPOULOU, A., ... & CHLICHIA, K. Extraction, chemical composition, and anticancer potential of *Origanum onites* L. essential oil. **Molecules**, v. 24, n. 14, p. 2612, 2019.

SPYRIDOPOULOU, K., TIPTIRI-KOURPETI, A., LAMPRI, E., FITSIOU, E., VASILEIADIS, S., VAMVAKIAS, M., ... & CHLICHIA, K. Dietary mastic oil extracted from *Pistacia lentiscus* var. *chia* suppresses tumor growth in experimental colon cancer models. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-14, 2017.

SINGH, S. et al. Lead phytochemicals for anticancer drug development. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 1667, 2016.

STANOJEVIĆ, L. P., STANOJEVIĆ, J. S., CVETKOVIĆ, D. J., & ILIĆ, D. P. Antioxidant activity of oregano essential oil (*Origanum vulgare* L.). **Biologica Nyssana**, v. 7, n. 2, p. 131-139, 2016.

TALEB, A., AHMAD, K.A., IHSAN, A., QU, J., LIN, N., HEZAM, K., ... E QILONG, D. Antioxidant effects and mechanism of silymarin in oxidative stress induced cardiovascular diseases. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 102, p. 689-698, 2018.

TAMARI, Y., NAWATA, H., INOUE, E., YOSHIMURA, A., YOSHII, H., KASHINO, G., ... & TANO, K. Protective roles of ascorbic acid in oxidative stress induced by depletion of superoxide dismutase in vertebrate cells. **Free radical research**, v. 47, n. 1, p. 1-7, 2013.

TAN, B. L.; NORHAIZAN, M. E. *Manilkara zapota* (L.) P. Royen leaf water extract triggered apoptosis and activated caspase-dependent pathway in HT-29 human colorectal cancer cell line. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 110, p. 748–757, 2019.

TAN, B. L.; NORHAIZAN, M. E. *Manilkara zapota* (L.) P. Royen leaf water extract triggered apoptosis and activated caspase-dependent pathway in HT-29 human

colorectal cancer cell line. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 110, n. June 2018, p. 748–757, 2019.

TAN, E. P.; DUNCAN, F. E.; SLAWSON, C. The sweet side of the cell cycle. **Biochemical Society Transactions**, v. 45, n. 2, p. 313–322, 2017.

TAVARES-CARREÓN, F. F., DE LA TORRE-ZAVALA, S., AROCHA-GARZA, H. F., SOUZA, V., GALÁN-WONG, L. J., & AVILÉS-ARNAUT, H.. In vitro anticancer activity of methanolic extract of *Granulocystopsis* sp., a microalgae from an oligotrophic oasis in the Chihuahuan desert . **PeerJ**, v. 8, p. e8686, 2020.

TEH, B. T., FEARON, E. R. Genetic and Epigenetic Alterations in Cancer. In: **Abeloff's Clinical Oncology**. Content Repository Only!, p. 209-224. E2. 2020.

TOYOKUNI, S. Novel aspects of oxidative stress-associated carcinogenesis. **Antioxidants & redox signaling**, v. 8, n. 7-8, p. 1373-1377, 2006.

TOYOKUNI, S. Novel aspects of oxidative stress-associated carcinogenesis. **Antioxidants & redox signaling**, v. 8, n. 7-8, p. 1373-1377, 2006.

VAN LOO, G., SAELENS, X., VAN GURP, M., MACFARLANE, M., MARTIN, S. J., & VANDENABEELE, P. The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. **Cell Death & Differentiation**, v. 9, n. 10, p. 1031-1042, 2002.

VENKATESULU, B. P., CHANDRASEKAR, V. T., GIRDHAR, P., ADVANI, P., SHARMA, A., ELUMALAI, T., ... & KRISHNAN, S. A systematic review and meta-analysis of cancer patients affected by a novel coronavirus. **JNCI Cancer Spectrum**, v. 5, n. 2, p. pkaa102, 2021.

VERA-RAMIREZ, L., RAMIREZ-TORTOSA, M., PEREZ-LOPEZ, P., GRANADOS-PRINCIPAL, S., BATTINO, M., & QUILES, J. L. Long-term effects of systemic cancer treatment on DNA oxidative damage: The potential for targeted therapies. **Cancer letters**, v. 327, n. 1-2, p. 134-141, 2012.

WALENSKY, L. D., & BIRD, G. H. Hydrocarbon-stapled peptides: principles, practice, and progress: miniperspective. **Journal of medicinal chemistry**, v. 57, n. 15, p. 6275-6288, 2014.

WENZEL, E. S.; SINGH, A. T. K. Cell-cycle checkpoints and aneuploidy on the path to cancer. **In Vivo**, v. 32, n. 1, p. 1–5, 2018.

WOHLBOLD, L., MERRICK, K. A., DE, S., AMAT, R., KIM, J. H., LAROCHELLE, S., ... & FISHER, R. P. Chemical genetics reveals a specific requirement for Cdk2 activity in the DNA damage response and identifies Nbs1 as a Cdk2 substrate in human cells. **PLoS genetics**, v. 8, n. 8, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer, 2018. Acesso em 23 de abril de 2020. Disponível em <<https://gco.iarc.fr/>>

WU, S.; POWERS, S., ZHU, W.; HANNUN, Y. A. Substantial contribution of extrinsic risk factors to cancer development. **Nature**, v. 529, n. 7584, p. 43, 2016.

XAVIER, A.L. **Estudo do potencial antitumoral do óleo essencial das folhas de *Lippia microphylla* Cham. (Verbenaceae) e sua toxicidade.** 2011. 95p.

Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – UFPB/ CCS, João Pessoa.

XAVIER, A. L., PITA, J. C. L., BRITO, M. T., MEIRELES, D. R., TAVARES, J. F., SILVA, M. S., ... & SOBRAL, M. V. Chemical composition, antitumor activity, and toxicity of essential oil from the leaves of *Lippia microphylla*. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 70, n. 5-6, p. 129-137, 2015.

XU, D. P., LI, Y., MENG, X., ZHOU, T., ZHOU, Y., ZHENG, J., ... & LI, H. B. Natural antioxidants in foods and medicinal plants: Extraction, assessment and resources. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 1, p. 96, 2017.

YARCHOAN, M., JOHNSON III, B. A., LUTZ, E. R., LAHERU, D. A., & JAFFEE, E. M. Targeting neoantigens to augment antitumour immunity. **Nature Reviews Cancer**, v. 17, n. 4, p. 209, 2017.

ZAMAN, S., WANG, R., & GANDHI, V. Targeting the apoptosis pathway in hematologic malignancies. **Leukemia & lymphoma**, v. 55, n. 9, p. 1980-1992, 2014.

ZAVYALOVA, M. V., DENISOV, E. V., TASHIREVA, L. A., SAVELIEVA, O. E., KAIGORODOVA, E. V., KRAKHMAL, N. V., & PERELMUTER, V. M.. Intravasation as a Key Step in Cancer Metastasis. **BIOCHEMISTRY (Moscow)**, v. 84, n. 7, p.. Intravasation as a Key Step in Cancer Metastasis. **BIOCHEMISTRY (Moscow)**, v. 84, n. 7, p. 762–772, 2019.

ZHANG, H., ZHANG, A., GUPTE, A. A., & HAMILTON, D. J.. Plumbagin Elicits Cell-Specific Cytotoxic Effects and Metabolic Responses in Melanoma Cells. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 5, p. 706, 2021.

ZOHREH, JAHANAFROOZ, Z., MOTAMED, N., RINNER, B., MOKHTARZADEH, A., & BARADARAN, B. SILIBININ to improve cancer therapeutics, as an apoptotic inducer, autophagy modulator, cell cycle inhibitor, and microRNAs regulator. **Life Sciences**, 2018.

ZOU, T.; LIN, Z. The Involvement of Ubiquitination Machinery in Cell Cycle Regulation and Cancer Progression. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 11, p. 5754, 2021.