

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FARMACOLOGIA

ESTUDO DA CITOTOXICIDADE DO ÁCIDO ROSMARÍNICO EM MODELOS
***IN VITRO* DE CÂNCER HUMANO**

MARCELE LORENTZ MATTOS DE SOUZA

VITÓRIA – ES
2017

MARCELE LORENTZ MATTOS DE SOUZA

**ESTUDO DA CITOTOXICIDADE DO ÁCIDO ROSMARÍNICO EM MODELOS
IN VITRO DE CÂNCER HUMANO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Farmacologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Leticia Batista Azevedo Rangel

Co-Orientador: Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos

VITÓRIA-ES
SETEMBRO/ 2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do
Espírito Santo, ES, Brasil)
Bibliotecário: Rafael Lima de Carvalho – CRB-6 MG-002926/O

S729e Souza, Marcele Lorentz Mattos de, 1981 -
Estudo da citotoxicidade do ácido rosmarínico em modelos in vitro de
câncer humano / Marcele Lorentz Mattos de Souza – 2017.
80 f. : il.

Orientador: Leticia Batista Azevedo Rangel.
Coorientador: Adair Roberto Soares dos Santos

Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Farmacologia) – Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Neoplasias Pulmonares. 2. Neoplasias Ovarianas. 3. Neoplasias da
Mama. I. Rangel, Leticia Batista Azevedo. II. Santos, Adair Roberto Soares
dos. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da
Saúde. IV. Título.

CDU: 61

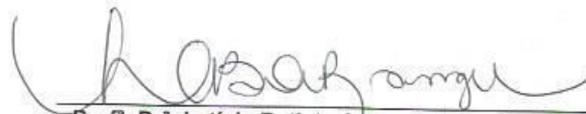
Marcele Lorentz Mattos de Souza

“Estudo da citotoxicidade do ácido rosmarínico em modelos *in vitro* de câncer humano”

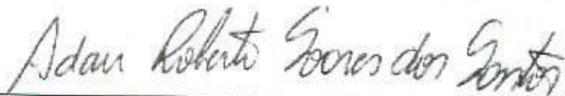
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Farmacologia.

Aprovada em 29 de setembro de 2017.

BANCA EXAMINADORA:



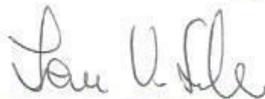
Prof.ª Dr.ª. Letícia Batista Azevedo Rangel – Orientadora, UFES



Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos – Coorientador, UFES



Prof.ª Dr.ª. Cristina Martins e Silva - Examinador Interno, UFES



Prof. Dr. Ian Victor Silva - Examinador Externo, UFES

Vitória

2017

AGRADECIMENTOS

À Deus porque dele, por ele e para ele são todas as coisas.

À minha família, em especial à minha mãe pelo apoio, suporte e todas as coisas de mãe, e ao meu pai (*in memoriam*) que viveu por mim, que tanto se orgulhou quando iniciei essa jornada e que sempre terá todos os meus pensamentos, minha gratidão e meu amor.

Ao meu marido Alex, meu amor e meu maior incentivador, por nunca duvidar de mim, por sempre acreditar que eu posso muito mais, por toda ajuda e apoio em, literalmente, todas as etapas desse projeto. Todo agradecimento é pouco perto de tudo o que você faz por mim! Metade dessa conquista é sua!

À minha orientadora, Prof.^a Letícia Batista Azevedo Rangel, por ter me acolhido tão prontamente em seu laboratório, pela orientação, ensinamentos e por sempre acreditar em mim e no meu trabalho.

Ao meu co-orientador, Prof. Adair Roberto Soares dos Santos, pela ideia inicial do projeto com o qual tanto me identifiquei.

Aos amigos do LBCMCH por toda ajuda no desenvolvimento desse projeto.

À Prof.^a Cristina Martins e Silva por ter cedido a substância objeto central do meu trabalho.

À Prof.^a Sylvania dos Santos Meyrelles pelo uso do citômetro e à Bianca Prandi Campagnaro pelas análises de citometria de fluxo.

Ao Prof. Dr. Ian Victor Silva, do Laboratório de Biologia Celular do Envelhecimento da Universidade Federal do Espírito Santo.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Rezende Kitagawa e à Prof.^a Dr.^a Rita de Cassia Ribeiro Gonçalves, do Laboratório de Triagem Biológica de Produtos Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo, pelo uso do leitor de Elisa.

Ao Criobanco pela parceria e disponibilidade de espaço e infraestrutura.

À Universidade Federal do Espírito Santo, local de realização desse projeto.

Às agências de fomento FAPES, CAPES e CNPq.

A todos que me acompanharam e incentivaram ao longo desse meu percurso acadêmico.

"Precisamos dar um sentido humano às nossas construções. E quando o amor ao dinheiro, ao sucesso, nos estiver deixando cegos, saibamos fazer pausas para olhar os lírios do campo e as aves do céu."

(Érico Veríssimo)

RESUMO

O câncer é uma das principais causas de morte em todo o mundo. A cada ano 8,2 milhões de pessoas morrem devido à doença. Dentre os tumores mais incidentes na população se destacam o câncer de pulmão e o câncer de mama. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o número de novos casos de câncer continuará aumentando apesar do enorme investimento no combate à doença. Somado a isso, o regime quimioterapêutico de primeira escolha para o tratamento destas doenças tem como limitação a alta toxicidade sistêmica e a quimiorresistência tanto inata quanto adquirida das células tumorais. Assim, várias substâncias naturais com potencial atividade antitumoral têm sido estudadas, dentre as quais se destaca o ácido rosmarínico (AR). O AR é um composto fenólico que ocorre naturalmente. É um éster derivado dos ácidos caféico e 3,4-dihidroxifenilático encontrado em diversas espécies vegetais, sendo originalmente isolado em 1958 da planta alecrim (*Rosmarinus officinalis*). O AR modula o sistema imunológico, possui ação anti-microbiana, neuroprotetora, inibe a proliferação celular e induz à apoptose (PETERSEN; SIMMONDS, 2003). Motivados pelas diversas atividades e benefícios do AR, realizamos um *screening* em um painel de linhagens de pulmão (H460/ A549), ovário (SKOV-3, A2780, OVCAR3) e mama (MCF-7/ MDAMB-231). Os resultados verificaram a eficácia citotóxica do AR em linhagens de câncer de mama triplo negativo MDAMB-231 e luminal A MCF-7 com redução de mais de 80% na viabilidade celular em monoterapia e aumento da sensibilidade aos quimioterápicos convencionais com redução drástica da IC₅₀ em terapia combinada com paclitaxel e cisplatina. Os dados de citotoxicidade *in vitro* obtidos até o momento sugerem que o AR pode ser um promissor agente quimioterapêutico no combate ao câncer, em especial, o câncer de mama.

Palavras-chave: câncer de pulmão; câncer de ovário; câncer de mama; ácido rosmarínico; citotoxicidade; quimiorresistência; PI3K.

ABSTRACT

Cancer is one of the leading causes of death worldwide. Every year 8.2 million people die from the disease. Among the most incident tumors in the population are lung cancer and breast cancer. According to the World Health Organization (WHO), the number of new cancers will continue to rise despite the huge investment in fighting the disease. Added to that, the chemotherapeutic regimen of first choice for the treatment of these diseases has as limitation the high systemic toxicity and both the innate and acquired chemoresistance of the tumor cells. Therefore, various natural substances with potential antitumor activity have been studied, among which rosmarinic acid (RA). RA is a naturally occurring phenolic compound. It is an ester derived from the caffeic and 3,4-dihydroxyphenylacetic acids found in various plant species, being originally isolated in 1958 from the rosemary plant (*Rosmarinus officinalis*). RA modulates the immune system, has action antimicrobial, neuroprotective, inhibits cell proliferation and induces apoptosis (PETERSEN; SIMMONDS, 2003). Motivated by the diverse activities and benefits of RA, we performed a screening in a panel of lung lines (H460/ A549), ovarian (SKOV-3, A2780, OVCAR3) and breast (MCF-7/ MDAMB-231). The results verified the cytotoxic efficacy of RA in triple negative breast cancer MDAMB-231 and luminal A MCF-7 with a reduction of more than 80% in cellular viability in monotherapy and increased sensitivity to conventional chemotherapeutic with drastic reduction of IC₅₀ in combination therapy with paclitaxel and cisplatin. The *in vitro* cytotoxicity data obtained so far suggest that RA may be a promising chemotherapeutic agent in the fight against cancer, especially, breast cancer.

Key words: lung cancer; ovarian cancer; breast cancer; rosmarinic acid; cytotoxicity; chemoresistance; PI3K.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estimativas de câncer para o ano de 2016, exceto pele não melanoma, na população brasileira, de acordo com o sexo.	15
Figura 2: Via de sinalização celular PI3K/AKT/mTOR.....	26
Figura 3: Estrutura molecular do ácido rosmarínico	27
Figura 4: <i>Rosmarinus officinalis</i>	28
Figura 5: Viabilidade celular metabólica das linhagens de pulmão A549 e H460 após tratamento com ácido rosmarínico por 48h.	41
Figura 6: Viabilidade celular metabólica das linhagens de pulmão A549 e H460 após tratamento com ácido rosmarínico por 72h.	42
Figura 7: Viabilidade celular metabólica das linhagens de ovário A2780, SKOV3 e OVCAR3 após tratamento com ácido rosmarínico por 48h.....	44
Figura 8: Viabilidade celular metabólica das linhagens de ovário A2780, SKOV3 e OVCAR3 após tratamento com ácido rosmarínico por 72h.....	44
Figura 9: Viabilidade celular metabólica da linhagem de ovário OVCAR3 após tratamento com ácido rosmarínico e cisplatina por 72h.	45
Figura 10: Viabilidade celular metabólica das linhagens MCF-7 e MDAMB231 após tratamento com ácido rosmarínico por 48h.	47
Figura 11: Viabilidade celular metabólica das linhagens MCF-7 e MDAMB231 após tratamento com ácido rosmarínico por 72h.	47
Figura 12: Estudo da viabilidade celular metabólica (VCM) da linhagem MCF-7 após tratamento com ácido rosmarínico e cisplatina por 72h.....	49
Figura 13: Viabilidade celular metabólica da linhagem MCF-7 após tratamento com ácido rosmarínico e paclitaxel por 72h.	49
Figura 14: Viabilidade celular metabólica da linhagem MDAMB231 após tratamento com ácido rosmarínico e cisplatina por 72h.	50
Figura 15: Viabilidade celular metabólica da linhagem MDAMB231 após tratamento com ácido rosmarínico e paclitaxel por 72h.	51
Figura 16: Ensaio de formação de colônia na linhagem MCF-7.....	53
Figura 17: Ensaio de formação de colônia na linhagem MDAMB-231.	53
Figura 18: Análise do ciclo celular na linhagem MDAMB-231 após tratamento com ácido rosmarínico e paclitaxel.	54
Figura 19: Análise da expressão de LC3 na linhagem MCF-7.	56

Figura 20: Análise da expressão de LC3 na linhagem MDAMB-231.....	56
Figura 21: Análise da expressão de P62 na linhagem MCF-7.	57
Figura 22: Análise da expressão de P62 na linhagem MDAMB-231.....	57
Figura 23: Via de regulação da autofagia.....	60
Figura 24: Análise da expressão de BAX na linhagem MCF-7.....	62
Figura 25: Análise da expressão de BAX na linhagem MDAMB-231.....	62

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Descrição dos anticorpos primários utilizados nos experimentos de análise da expressão proteica.....	40
Quadro 2: IC ₅₀ estimada para as linhagens de CAM MCF-7 e MDAMB231 em 72h	48
Quadro 3: valor da IC ₅₀ estimada para os agentes cisplatina e paclitaxel em monoterapia e em associação com o AR nas linhagens MCF-7 e MDAMB-231, em 72h.	51

LISTA DE SIGLAS

ACS	<i>American Cancer Society</i>
AKT	Proteína cinase B
AMPK	Proteína cinase ativada por adenosina monofosfato
AR	Ácido rosmarínico
Atg	<i>Autophagy</i>
ATP/AMP	Adenosina trifosfato/monofosfato
A β	Proteína β -amilóide
BRCA1/2	Gene supressor tumoral <i>breast cancer 1/2</i>
CAM	Câncer de mama
CAOV	Câncer de ovário
CAT	Catalase
CI	Índice de combinação
CISP	Cisplatina
COX-2	Ciclooxigenase 2
CP	Câncer de pulmão
CYP450	Família do citocromo P450
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Deoxinucleosídeos trifosfatos
GDP/GTP	Guanosina difosfato/trifosfato
GSH-Px	Glutaciona peroxidase
mLST8	Subunidade do complexo de rapamicina LST8
HER2	Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano
IC ₅₀	Concentração inibitória de 50%
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
Ki67	Antígeno identificado pelo anticorpo monoclonal Ki-67
mTOR	Serina/treonina cinase alvo de rapamicina em mamífero
mTORC1/2	Complexo 1/2 de mTOR
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NF-K β	Fator nuclear kappa B
NSCLC	<i>Non-small cell lung cancer</i>

OMS	Organização Mundial de Saúde
p53	Oncogene 53
PBS	Tampão salino- fosfato
PKD1	Proteína cinase-1 dependente de 3-fosfoinositol
Pgp	Glicoproteína P
PI3K	Fosfatidilinositol 3-cinase
PIP ₂	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PIP ₃	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
PRAS40	Substrato Akt rico em prolina de 40kD
PTEN	Gene que codifica a fosfatase homóloga à tensina
PTX	Paclitaxel
Raptor	Complexo de mTOR sensível à rapamicina
RE	Receptor de estrogênio
Rheb	Proteína homóloga ao RAS enriquecida no cérebro
Rictor	Complexo de mTOR insensível à rapamicina.
RP	Receptor de progesterona
SCLC	<i>Small cell lung cancer</i>
SOD	Superóxido dismutase
STAT-3	Gene transdutor de sinal e ativador de transcrição 3
TNBC	<i>Triple-negative breast cancer</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral
TSC	Complexo esclerose tuberosa
VCM	Viabilidade celular metabólica

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 CÂNCER DE PULMÃO	16
2.2 CÂNCER DE OVÁRIO	19
2.3 CÂNCER DE MAMA.....	21
2.4 VIA DE SINALIZAÇÃO CELULAR PI3K/AKT/mTOR	24
2.5 ÁCIDO ROSMARÍNICO	27
3 OBJETIVOS	34
3.1 OBJETIVO CENTRAL	34
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
4 MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1 LINHAGENS CELULARES E CONDIÇÕES DE CULTIVO	35
4.2 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR METABÓLICA (VCM)	35
4.3 CÁLCULO DO IC ₅₀ ESTIMADO DAS DROGAS TESTADAS.....	37
4.4 ENSAIO DE FORMAÇÃO DE COLÔNIA	37
4.5 ENSAIO DE CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO	37
4.6 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS	38
4.7 IMUNOBLLOT	39
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1 ÁCIDO ROSMARÍNICO NÃO INIBE A VIABILIDADE CELULAR METABÓLICA EM LINHAGENS DE CÂNCER DE PULMÃO	41
5.2 EFEITO DO ÁCIDO ROSMARÍNICO NA VIABILIDADE CELULAR METABÓLICA EM LINHAGENS DE CÂNCER DE OVÁRIO	43
5.3 EFEITO DO ÁCIDO ROSMARÍNICO NA VIABILIDADE CELULAR METABÓLICA EM LINHAGENS DE CÂNCER DE MAMA.....	46

5.4 EFEITO DO ÁCIDO ROSMARÍNICO NA FORMAÇÃO DE COLÔNIAS EM LINHAGENS CELULARES DE CÂNCER DE MAMA.....	52
5.5 EFEITO DO ÁCIDO ROSMARÍNICO NAS ALTERAÇÕES DO CICLO CELULAR NAS LINHAGENS DE CÂNCER DE MAMA	54
5.6 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS QUE PODEM ESTAR ENVOLVIDAS NOS MECANISMOS DE AÇÃO DO ÁCIDO ROSMARÍNICO ..	55
6 CONCLUSÃO	63
7 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	64
8 REFERÊNCIAS.....	66

1 INTRODUÇÃO

Câncer é o conjunto de mais de 100 tipos de doenças caracterizado pelo crescimento incontrolado de células anormais, podendo se espalhar para outras regiões do corpo.

As causas são variadas, podendo ser internas ou externas ao organismo, estando ambas inter-relacionadas. Cerca de 10% dos cânceres são causados por fatores hereditários. A grande maioria dos cânceres, entretanto, é esporádica e adquirida pela exposição a agentes químicos, físicos ou virais. Em ambos os casos, o dano genético ocorre em genes que afetam o equilíbrio de vários processos biológicos como angiogênese, crescimento celular, proliferação, apoptose, invasão e metástase (SILVA JR., 2009; INCa, 2016).

Atualmente, o câncer é responsável por uma em cada seis mortes no mundo. Dados da Organização Mundial de Saúde indicam que mais de 14 milhões de pessoas desenvolvem câncer todos os anos, e é esperado que esse número aumente para mais de 21 milhões de casos em 2030, o que torna este tipo de doença um problema inquestionável de saúde pública (INCa, 2016).

Em 2017, nos Estados Unidos, são esperados 1.688.780 novos casos de câncer, sendo a segunda causa de morte mais comum com uma estimativa de 600.920 casos de morte por câncer (ACS, 2017).

No Brasil, para o biênio 2016-2017, estimam-se cerca de 600 mil novos casos. Sem contar os casos de câncer de pele não melanoma, os tipos de câncer mais incidentes na população masculina são próstata (28,6%), pulmão (8,1%), intestino (7,8%), estômago (6,0%) e cavidade oral (5,2%). Nas mulheres, os cânceres de mama (28,1%), intestino (8,6%), colo do útero (7,9%), pulmão (5,3%), estômago (3,7%) e ovário (3,0%) são os mais frequentes (FIGURA 1) (INCa, 2016).

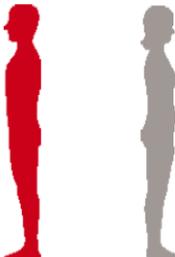
Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	61.200	28,6%	Homens 	Mulheres	Mama feminina	57.960	28,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%			Cólon e Reto	17.620	8,6%
Cólon e Reto	16.660	7,8%			Colo do útero	16.340	7,9%
Estômago	12.920	6,0%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Cavidade Oral	11.140	5,2%			Estômago	7.600	3,7%
Esôfago	7.950	3,7%			Corpo do útero	6.950	3,4%
Bexiga	7.200	3,4%			Ovário	6.150	3,0%
Laringe	6.360	3,0%			Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Leucemias	5.540	2,6%			Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

Figura 1: Estimativas de câncer para o ano de 2016, exceto pele não melanoma, na população brasileira, de acordo com o sexo.

Fonte: INCA, 2016. *Números arredondados para múltiplos de 10.

O cenário epidemiológico do câncer assinala para a ineficiência tanto das ferramentas diagnósticas e prognósticas quanto das estratégias terapêuticas disponíveis. Neste contexto, vale destacar os registros elevados de quimiorresistência tanto inata quanto adquirida pelas células tumorais. Sendo assim, é fundamental a inclusão de estratégias e tratamentos mais efetivos para o controle de tumores e de seus fatores de risco.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CÂNCER DE PULMÃO

O câncer de pulmão (CP) é o mais comum de todos os tumores malignos e a principal causa de morte por câncer em homens e mulheres (ACS, 2017) possuindo uma taxa de mortalidade de, aproximadamente, 90% (INCa, 2016).

Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde cerca de um milhão e setecentos mil novos casos são diagnosticados a cada ano. No Brasil, para 2016, foram estimados 17.330 novos casos de câncer de traquéia, brônquios e pulmão em homens e 10.890 em mulheres (INCa, 2016).

Apesar da maior prevalência do CP entre indivíduos do sexo masculino, as estimativas mostram um aumento gradativo da incidência nas mulheres em relação aos homens. Acredita-se que este aumento esteja relacionado ao hábito de fumar, que vem se tornando cada vez mais comum entre a população feminina. Nos últimos 20 anos, houve um aumento de 134% na incidência de CP entre as mulheres, tornando-se o segundo câncer mais letal na população feminina, enquanto que, nos homens, esse crescimento foi de 57% (NOVAES et. al., 2008).

O CP é caracterizado pelo desenvolvimento precoce de metástases, alta taxa de recidiva e taxa de sobrevida de 10% a 15% em cinco anos (GAO et. al., 2106; INCa, 2016). É uma das neoplasias com menor taxa de cura, visto que mais de 75% dos pacientes são diagnosticados em um estágio avançado da doença quando as opções terapêuticas são limitadas (GAO et. al., 2016; SABAS et. al., 2012).

Considerada uma doença de comportamento heterogêneo, o CP compreende diversos tipos histológicos com atividade biológica e agressividade distintos. A maioria das neoplasias de pulmão são carcinomas de origem epitelial (95%) e podem ser divididos em dois grandes grupos: câncer de pequenas células (SCLC) e câncer de não-pequenas células (NSCLC) (FERNANDEZ; JATENE; ZAMBONI, 2002).

O câncer de pequenas células é mais raro e tem comportamento mais agressivo, representando 18% dos casos de carcinoma broncogênico. Ao contrário do SCLC, o câncer de não-pequenas células é mais comum e pode ser dividido em três subtipos histológicos principais: carcinoma espinocelular ou de células escamosas, adenocarcinoma e carcinoma indiferenciado de grandes células. Vale ressaltar que 70% dos casos de NSCLC são dos tipos adenocarcinoma e carcinoma espinocelular (SABAS et. al., 2012).

Clinicamente, os carcinomas pulmonares são classificados apenas em NSCLC e SCLC, entretanto, a Organização Mundial de Saúde reconhece sete tipos de CP: carcinoma espinocelular, carcinoma de pequenas células, adenocarcinoma, carcinoma de grandes células (neuroendócrino e não neuroendócrino), carcinoma adenoescamoso, carcinoma pleomórfico e sarcomatóide, e tumor carcinóide (NOVAES et. al., 2008; CAPELOZZI, 2009).

O tabagismo é o principal fator de risco para o desenvolvimento desse tipo de tumor. Geralmente, os fumantes têm cerca de 20 a 30 vezes mais risco de desenvolver esse tipo de neoplasia quando comparados a pessoas que nunca fumaram. A inflamação da via aérea causada pelo tabaco resulta em dano repetido à célula epitelial, provocando sua rápida substituição e levando a uma propagação de erros no DNA celular e, conseqüentemente, a um aumento da carcinogênese (MALKINSON, 2005). Apesar do tabagismo ser responsável pela maioria dos casos de CP (80%), existem outros fatores importantes para o desenvolvimento da doença: exposição a carcinógenos ocupacionais e ambientais como radônio, asbesto, sílica, poluição do ar, tabagismo passivo, emissão da combustão derivada do carvão, bem como repetidas infecções pulmonares, história de tuberculose e doença pulmonar obstrutiva crônica (HUGHES; WEIL, 1991; SAMET, 1994; DOLL, 1995; ZAMBONI, 2013).

Além disso, alterações genéticas também podem ser responsáveis pela doença uma vez que somente 10% a 15% dos fumantes desenvolvem CP. Mutações no gene supressor tumoral p53 (oncogene 53), família do citocromo P450 (CYP450), oncogenes transdutor de sinal extracelular da família ras (vírus do sarcoma de rato) e da família myc (vírus do mielocitoma) ou defeitos em oncogenes recessivos supressor de tumor como o rb (retinoblastoma) estão relacionados ao desenvolvimento de CP (SILVA JR, 2009). CYP450 é uma

superfamília de proteínas responsável por facilitar a excreção de substâncias indesejáveis ao organismo (de origem endógena) e pela biotransformação de vários medicamentos. Dependendo do gene e do polimorfismo, as drogas podem ser metabolizadas rapidamente ou lentamente (OGU; MAXA, 2000).

Fármacos quimioterápicos como o tamoxifeno e a ciclofosfamida são metabolizados por CYP2D6 (citocromo P450 2D6), CYP2C19 (citocromo P450 2C19) e CYP2B6 (citocromo P450 2B6). Variações nos genes do CYP450 podem alterar a função das enzimas e, conseqüentemente, fornecer um mecanismo para a resistência aos medicamentos em tumores. As enzimas do citocromo P450 representam 70% a 80% das enzimas envolvidas no metabolismo de um fármaco (NIH, 2017; INGELMAN-SUNDBERG, 2006)

As manifestações clínicas do CP são variáveis e estão relacionadas com o crescimento do tumor primário e com os sítios de doença metastática. A tosse, seca ou produtiva, é o sintoma mais comum e está presente em até 75% dos casos. Lesões endobrônquicas relacionadas com o crescimento local do tumor também podem determinar hemoptise, dispnéia e sibilo. Dentre os sintomas relacionados a metástases à distância, pode-se citar dor óssea, cefaléia, náuseas, perda de apetite e emagrecimento (UEHARA; JAMNIK; SANTORO, 1998).

O tratamento padrão nos estágios iniciais do CP é a ressecção cirúrgica. Nestes casos, a chance de cura é grande e a sobrevida em cinco anos é de 40% a 67%. Entretanto, apenas 25% dos pacientes com esse tipo de neoplasia apresentam doença operável no momento do diagnóstico. Em pacientes com doença localizada no pulmão e nos linfonodos, o tratamento é realizado com radioterapia e quimioterapia. Em casos com metástases à distância o tratamento é realizado com quimioterapia ou, em casos selecionados, algumas medicações via oral (terapia alvo) (SCHILER et. al., 2002; RECK et. al., 2013)

Porém, a maneira como a quimioterapia é administrada depende do tipo ou estágio do câncer no início do tratamento. No NSCLC a terapia padrão era baseada em compostos à base de cisplatina, entretanto novas drogas foram incorporadas ao tratamento, como paclitaxel, docetaxel, gemcitabina, vinorelbina e vimblastina. No câncer de pequenas células o tratamento é realizado com

paclitaxel e derivados de platina (cisplatina ou carboplatina) tendo uma resposta de 25% (RECK et. al., 2013; SCHILER et. al., 2002).

Entretanto, apesar dos avanços científicos e tecnológicos, o carcinoma broncogênico tem um prognóstico bastante sombrio. A agressividade do tumor, o diagnóstico tardio e os medicamentos quimioterápicos altamente citotóxicos, tanto para células cancerosas quanto para células saudáveis, tornam esse tipo de neoplasia altamente letal e com menor taxa de cura.

2.2 CÂNCER DE OVÁRIO

O câncer de ovário (CAOV) é considerado o câncer ginecológico mais difícil de ser diagnosticado e o de menor chance de cura, pois a maioria dos tumores malignos de ovário só se manifesta em estágio avançado. Apresenta baixa prevalência e alta mortalidade, representando cerca de 30% de todos os cânceres ginecológicos. A estimativa mundial, realizada em 2012, mostrou que ocorreram cerca de 240.000 casos novos de CAOV com um risco estimado de 6,1 casos a cada 100 mil mulheres (INCa, 2016).

Para o ano de 2017, nos Estados Unidos, são esperados 22.440 novos casos de CAOV e 14.080 casos de morte por este tipo de neoplasia (ACS, 2017). Para o Brasil, em 2016, foram estimados 6.150 novos casos com um risco de 5,95 casos a cada 100 mil mulheres (INCa, 2016).

De acordo com a classificação, o CAOV é uma doença heterogênea que compreende tumores de diferentes tipos histológicos com características clínicas e moleculares distintas. Inicialmente, os tumores de ovário podem ser divididos em três principais tipos de acordo com o tipo celular que originou o tumor: carcinoma estromal, carcinoma de células germinativas e carcinoma epitelial (ALGECIRAS-SCHIMNICH, 2013).

O carcinoma estromal se origina a partir de células do tecido conjuntivo que constituem os ovários e produzem os hormônios estrogênio e progesterona. É o tipo mais raro (1%) e se diagnosticado em estágio inicial possui um bom prognóstico, com uma sobrevivência de mais de 75%. O carcinoma de células germinativas se desenvolve a partir das células que produzem os óvulos.

Corresponde a menos de 2% dos cânceres de ovário e possui um bom prognóstico, com uma sobrevida de mais de 90% em 5 anos. Por sua vez, o carcinoma epitelial é o tipo mais comum, correspondendo a cerca de 85% a 90% dos cânceres de ovário. Se desenvolve a partir das células que cobrem a superfície externa do ovário e de outros órgãos como tuba de falópio, intestino e endométrio. Os tumores de origem epitelial ainda podem ser divididos, de acordo com o padrão predominante de diferenciação das células tumorais, em quatro subtipos: seroso, mucinoso, endometrióide e de células claras (KAKU et. al., 2003; SHIH; KURMAN, 2004).

O desenvolvimento dos tumores de ovário está relacionado a fatores genéticos, ambientais e hormonais. História familiar, idade maior que 50 anos, infertilidade, obesidade, menopausa tardia e nuliparidade são alguns dos principais fatores de risco. A inflamação crônica causada pela endometriose, além de problemas reprodutivos, também pode contribuir para o desenvolvimento desse tipo de neoplasia. Estima-se que 90% dos CAOVS ocorram esporadicamente, ou seja, independem de herança familiar (MORCH et. al., 2009; SCHÜLER et. al., 2013)

Entretanto, mutações genéticas podem aumentar o risco desse tipo de tumor. Alterações nos genes BRCA1 e BRCA2 (gene supressor tumoral *breast cancer 1* e 2) são responsáveis pela maioria dos casos de câncer de ovário hereditário, e mulheres que apresentam mutações nesses genes desenvolvem o CAOVS mais cedo quando comparado àquelas acometidas por cânceres esporádicos. Portadoras de mutações no gene BRCA1 apresentam um risco estimado entre 35% a 70% e de 10% a 30% para as que exibem mutações no gene BRCA2 (CLARKE-PEARSON, 2009; NGUYEN et. al., 2013).

A maioria dos tumores malignos do ovário só apresenta manifestações clínicas nos estágios mais avançados da doença, circunstância em que há comprometimento peritoneal e metástases à distância. Frequentemente, na fase inicial, os sinais não são patognomônicos, assim, aproximadamente 70% das pacientes são diagnosticadas tardiamente. Na realidade, a maioria das mulheres diagnosticadas com CAOVS apresenta sinais e sintomas que se confundem com condições benignas, principalmente relacionadas ao trato gastrointestinal como aumento do volume abdominal, constipação intestinal ou diarreia, dores

abdominais, dificuldade para se alimentar ou rápida sensação de saciedade e emagrecimento (OZOLS, 2006; GUBBELS et. al., 2010).

Um dos aspectos fundamentais para definir a estratégia terapêutica a ser empregada contra o CAOv é o estadiamento correto dos tumores no momento do diagnóstico. Além disso, o tipo do tumor, idade e condições de saúde da paciente, também são importantes para nortear a escolha terapêutica. O tratamento padrão inclui cirurgia citoredutora seguida de quimioterapia baseada em derivados de platina, como cisplatina e carboplatina, e taxanos (paclitaxel e docetaxel) (LISTER-SHARP et. al., 2000; MCGUIRE; MARKMAN, 2003).

Porém, o CAOv é uma doença altamente maligna em mulheres sendo o maior problema a recorrência com células resistentes aos fármacos após a quimioterapia, além disso, a alta toxicidade dos agentes quimioterápicos limita a dosagem a ser utilizada. Nesse contexto, o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos relativamente não tóxicos, seja em esquemas monoterápicos ou politerápicos, poderá melhorar o resultado terapêutico sem aumentar os efeitos colaterais.

2.3 CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama (CAM) é considerado o principal tipo de câncer na mulher, depois do câncer de pele não melanoma, sendo responsável por 25% de novos casos a cada ano. Segundo a Sociedade Americana do Câncer, nos Estados Unidos, são estimados 252.710 novos casos de CAM invasivo e 63.410 de carcinoma *in situ*, para o ano de 2017 (ACS, 2017). Para o Brasil, em 2016, foram esperados 57.960 novos casos, com um risco estimado de 56,20 casos a cada 100.000 mulheres (INCa, 2016).

Dentre outros aspectos, a complexidade do CAM se deve ao fato de ser uma doença fenotípica e genotipicamente heterogênea com relação à clínica e à morfologia, apresentando mais de 20 subtipos diferentes (POLYAK, 2007; RIVENBARK; O'CONNOR; COLEMAN, 2013). Atualmente, o CAM é classificado de acordo com as suas características histológicas, moleculares e imuno-histoquímicas.

A classificação histológica é baseada na diversidade das características morfológicas dos tumores mamários. Inicialmente, os tumores de mama são divididos em invasivos ou localizados (*in situ*). Os carcinomas *in situ* estão limitados aos ductos e lóbulos, não entrando em contato com os vasos linfáticos e não produzindo metástases tendo, portanto, uma maior sobrevida. São subclassificados em ductal e lobular. O carcinoma ductal *in situ* é responsável por cerca de 10% a 30% dos casos de câncer de mama. De acordo com a sua morfologia e avaliação histológica, é classificado em cinco subtipos: comedocarcinoma, cribriforme, sólido, papilar e micropapilar. Estima-se em 30% a chance de um carcinoma ductal *in situ* não tratado evoluir para uma lesão infiltrativa após 10 anos (TAVASSOLI; DEVILEE, 2003; RAKHA, 2010).

Entretanto, se o carcinoma se estende além da membrana basal alcançando a vasculatura e outros locais do corpo, ele é considerado invasivo. Os carcinomas invasivos são morfológicamente subdivididos de acordo com os padrões de crescimento e grau de diferenciação. A maioria dos tumores de mama se originam no epitélio ductal e são conhecidos como carcinoma ductal invasivo (cerca de 80%). Outros subtipos de tumores invasivos que podem ser diagnosticados são conhecidos como carcinoma lobular, tubular, mucinoso, medular e papilar (GOBBI, 2012).

A definição segundo o perfil molecular e imuno-histoquímico é baseada na expressão dos receptores de estrogênio (RE) e progesterona (RP), superexpressão da proteína HER2 (receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano) e índice de proliferação celular Ki67 (anticorpo monoclonal que detecta um antígeno nuclear, expressando células que entram no ciclo celular e medindo a fração de crescimento celular) (VODUC; CHEANG; TYLDESLEY, 2010; KREIKE et. al., 2007). De acordo com os diferentes fenótipos obtidos, são definidos quatro subtipos: luminal A (RE+ e/ou RP+, HER2-, Ki67 < 14%), luminal B (RE+ e/ou RP+, HER2+, Ki67 > 14%), HER2 (RE-, RP-, HER2+, Ki67 variável) e triplo negativo (RE-, RP-, HER2-) (GOLDHIRSCH et. al., 2011).

Os tumores luminais têm sido associados a prognósticos mais favoráveis, enquanto o subtipo triplo negativo (TNBC) a prognósticos mais reservados (CAREY et. al., 2006). Os TNBC representam cerca de 10% a 15%

dos tumores mamários. Ademais, a terapia hormonal e os medicamentos que têm como alvo o HER2 não são tratamentos eficazes para esse subtipo, apresentando maior risco de recorrência no período de três anos e maiores taxas de mortalidade em cinco anos quando comparados aos outros subgrupos (BAUER et. al., 2007; CAREY et. al., 2006).

Além desses subtipos clássicos, mais tarde foi descrito um novo subtipo molecular de CAM, denominado *claudin-low*. São tumores também triplo-negativos, com baixa expressão de genes das claudinas 3, 4 e 7, e perda da glicoproteína membranar E-caderina, além da baixa expressão dos receptores hormonais e genes relacionados à via do HER2 (HERSCHKOWITZ et. al., 2007; PRAT et. al., 2010; BARROS; LEITE, 2015).

O CAM é uma doença multifatorial tendo como causa fatores biológicos (endócrinos), vida reprodutiva, comportamento e estilo de vida, como menarca precoce, menopausa tardia, obesidade e sedentarismo, consumo de álcool, exposição a radiações ionizantes e primeira gravidez tardia. História familiar de câncer de mama e alterações em genes, como os da família BRCA, bem como o aumento da expressão do HER2 também aumentam o risco de desenvolver esse tipo de neoplasia (SINGLETARY, 2003).

O sinal mais comum desse tipo de tumor é a presença de nódulo com bordas irregulares e geralmente indolor, que está presente em cerca de 90% dos casos. Outros possíveis sintomas incluem: pele da mama avermelhada, retraída ou com aspecto de “casca de laranja”, alterações no mamilo, pequenos nódulos nas axilas ou pescoço e secreção mamilar (ACS, 2017).

As modalidades terapêuticas para o CAM são a cirurgia e radioterapia para tratamento loco-regional e a quimioterapia e hormonioterapia para tratamento sistêmico. A quimioterapia ainda pode ser dividida em neoadjuvante ou adjuvante. Neoadjuvante é o tratamento citotóxico anterior à cirurgia, recomendada para os tumores em estágios avançados não operáveis e nos casos de doenças metastáticas. Essa modalidade terapêutica também pode ser utilizada em tumores iniciais, com o intuito de diminuir o tamanho da massa tumoral e assim realizar a cirurgia de mama conservadora. Enquanto que a terapia adjuvante é o tratamento complementar aplicado após o tratamento primário, como a cirurgia (COSTA; CHAGAS, 2013).

Os medicamentos padrão utilizados para a quimioterapia adjuvante e neoadjuvante neste tipo de neoplasia incluem antraciclinas (doxorrubicina) e taxanos (paclitaxel e docetaxel). Entretanto, estudos recentes têm apontado que a adição de carboplatina neoadjuvante ao regime contendo antraciclinas e taxanos tem aumentado a resposta patológica ao tratamento em pacientes com mutações nos genes BRCA1 e BRCA2 (LI et. al., 2016; HAHNEN et. al., 2017).

Contudo, o regime quimioterapêutico de primeira escolha para o tratamento destas doenças tem como limitação a alta toxicidade sistêmica e a quimiorresistência tanto inata quanto adquirida das células tumorais. Assim, várias substâncias naturais têm sido estudadas com o intuito de amenizar os adversos efeitos da terapia convencional.

2.4 VIA DE SINALIZAÇÃO CELULAR PI3K/AKT/mTOR

Durante o desenvolvimento de um tumor, vários eventos celulares podem ser desregulados possibilitando às células tumorais acumular alterações em seu DNA. Dentre eles podemos citar o aumento do crescimento e proliferação celular, maior resistência ao mecanismo de morte celular, maior vulnerabilidade à instabilidade genômica e mutações. Essa desregulação é causada, principalmente, por alterações na atividade ou na expressão das proteínas constituintes das vias de sinalização celular. Nesse contexto, a via de PI3K (fosfatidilinositol 3-cinase) possui um importante papel biológico, pois regula vários processos celulares, tais como angiogênese, proliferação, crescimento, diferenciação celular, autofagia e apoptose (SOUZA et. al., 2014).

A PI3K compõe uma família de cinase lipídica intracelular que fosforila o grupo 3'-hidroxil de fosfatidilinositol das membranas celulares. Essa ativação consiste em catalisar a formação de PIP₂ (fosfatidilinositol-4,5-bifosfato) em PIP₃ (fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato). A serina-treonina cinase AKT (proteína cinase B) é uma proteína efetora central do PIP₃. A AKT é ativada por um duplo mecanismo regulatório que requer a translocação e ancoramento na membrana plasmática sendo, em seguida, fosforilada nos aminoácidos treonina 308 e serina 473 pelas proteínas PDK1 (proteína cinase-1 dependente de 3-

fosfoinositol) e mTORC2 (proteína reguladora de mamífero para rapamicina C2) (PETRULEA et. al., 2015; SARBASSOV et. al., 2006).

Por sua vez, PTEN (gene que codifica a fosfatase homóloga à tensina) é uma fosfatase lipídica que atua na desfosforilação de PIP₃ fazendo um *feedback* negativo sobre a ação de PI3K e, portanto, assumindo um papel de supressor tumoral. A presença de PTEN mantém a concentração de PIP₃ baixa, enquanto sua ausência aumenta os níveis de PIP₃ aumentando a atividade de AKT. Sendo assim, a ativação de PI3K por sinalização dependente de fatores de crescimento, promove a síntese de PIP₃ que é desfosforilado por PTEN a PIP₂. Na ausência de PTEN, AKT torna-se constantemente fosforilada (ativada), podendo mediar a ativação de diversas proteínas que regulam a sobrevivência e o crescimento tumoral (PETRULEA et. al., 2015; SARBASSOV et. al., 2006)

Como mencionado anteriormente, a proteína mTOR (serina/treonina cinase alvo de rapamicina em mamífero) é uma serina/treonina cinase pertencente ao grupo das PI3K. É formada por duas subunidades funcionais: mTORC1 e mTORC2. A mTORC1 é um complexo sensível à rapamicina que regula a autofagia e o crescimento celular e é composta pelas proteínas mTOR, Raptor (complexo de mTOR sensível à rapamicina), GβL (ou mLST8) e PRAS40 (inibidor da mTOR). A mTORC2, por sua vez, liga-se a Rictor, um complexo de mTOR que é insensível à rapamicina (TATO et. al., 2010).

O complexo esclerose tuberosa (TSC), formado por TSC1 e TSC2, é o principal regulador da via de sinalização de mTOR. Esse complexo TSC1-TSC2 contém um domínio ativador GTPases (GAP), que resulta na conversão da GTPase Rheb (proteína homóloga ao RAS enriquecida no cérebro) em sua forma inativa (ligada a GDP). Através da inativação de Rheb, o TSC atua inibindo mTORC1. Em condições energéticas e celulares normais, a proteína AKT inibe o TSC1 e o TSC2 é fosforilado (inibido) pela enzima AMPK (proteína cinase ativada por adenosina monofosfato) quando ATP/AMP (adenosina trifosfato/monofosfato) se encontra elevada. Essa inibição do complexo TSC1-TSC2 resulta na manutenção de Rheb e, conseqüentemente, de mTOR nas suas formas ativas (ENGELMAN et. al. 2006; JACINTO et. al., 2004) (Figura 2).

Evidências mostram uma variedade de malignidades decorrentes da desregulação na sinalização da via de PI3K. Esta via está superativada em uma

ampla gama de tumores e desencadeia uma cascata de respostas que impulsionam a progressão tumoral e a quimiorresistência. Uma das causas do câncer de pulmão é a inativação de PTEN (FORGACS et. al., 1998). O câncer de ovário pode ser derivado de um desbalanço e mutações em PTEN, elevada atividade da proteína cinase AKT1, superexpressão de AKT2 e amplificação e mutação das subunidades p85 α e p110 α de PI3K (BELLACOSA et. al., 1995; SHAYESTEH et. al., 1999; SAITO et. al., 2000; SUN et. al., 2001). O câncer de mama, por sua vez, pode ser causado por um aumento na atividade da cinase AKT1, superexpressão de AKT2, mutação em PTEN e elevada ativação de PI3K (SUN et. al., 2001; BELLACOSA et. al., 1995; BARLUND et. al., 2000). Assim, agentes terapêuticos que interferem na sinalização de PI3K podem causar um severo dano às células cancerosas bloqueando muitos aspectos do fenótipo das células tumorais.

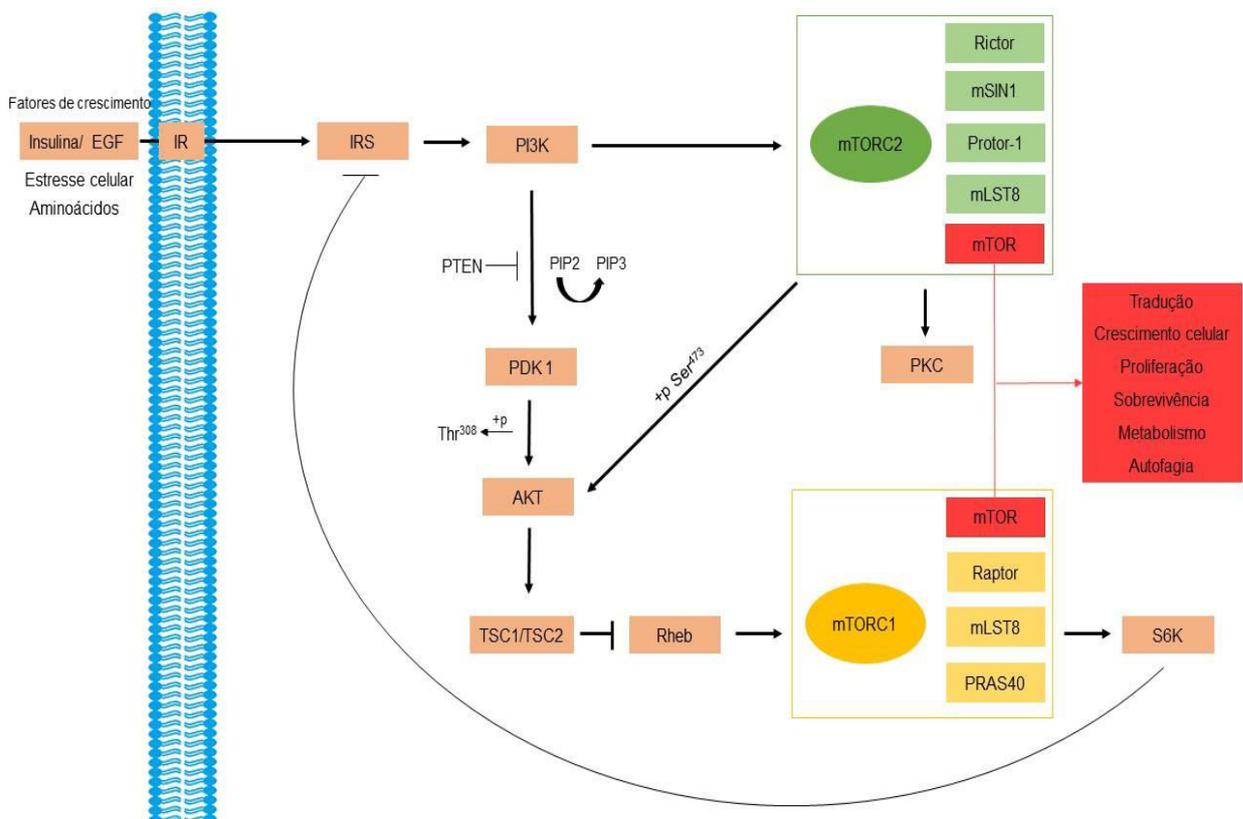


Figura 2: Via de sinalização celular PI3K/AKT/mTOR

2.5 ÁCIDO ROSMARÍNICO

Drogas antineoplásicas convencionais são utilizadas para erradicar células malignas, entretanto, recidivas devido à remoção incompleta do câncer e efeitos colaterais graves em órgãos normais são frequentes com a quimioterapia. Por esta razão, novas abordagens para melhorar a eficiência e tolerância aos agentes quimioterapêuticos são urgentemente necessários no tratamento anticâncer. Substâncias naturais têm sido uma opção promissora no combate ao câncer, uma vez que 60% dos medicamentos antineoplásicos aprovados são originários da natureza (NEWMAN; CRAGG, 2012).

Muitos estudos têm relatado a atividade biológica do ácido rosmarínico (AR) bem como seu papel farmacêutico e aplicações biotecnológicas. Com relação aos seus aspectos no campo biotecnológico, muitas revisões têm sido publicadas na última década (KHOJASTEH et. al., 2014; BULGAKOV; INYUSHKINA; FEDOREYEV, 2012).

O AR, classificado como um polifenol, é um éster derivado dos ácidos caféico e 3,4-dihidroxifenilático encontrado naturalmente em diversas espécies vegetais. Possui fórmula molecular $C_{18}H_{16}O_8$ e é também designado pelos nomes ácido α -O-cafeoil-3,4-di-hidroxifenilático; ácido α -[3-(3,4-dihidroxifenil)-1-oxo-2-propenil]-3,4-di-hidroxi-benzenopropanóico; ácido 3-(3,4-di-hidroxifenil)-2-[3-(3,4-di-hidroxifenil)-1-oxo-2-propeniloxi]-propanóico; ácido rosemárico (Figura 3).

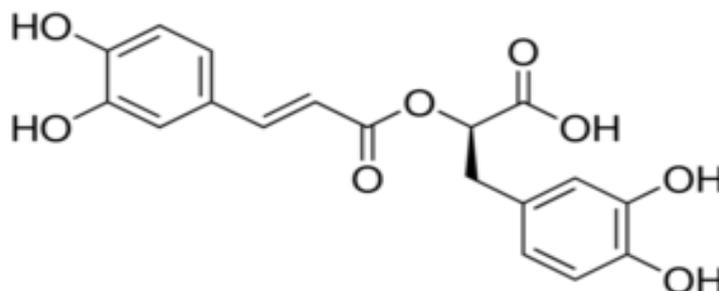


Figura 3: Estrutura molecular do ácido rosmarínico
Fonte: Sigma-Aldrich

É um dos principais compostos hidrofílicos do *Rosmarinus officinalis* (alecrim), do qual ele foi originalmente isolado em 1958 pelos químicos italianos Scarpati e Oriente (PETERSEN; SIMMONS, 2003). O alecrim pertence à família Lamiaceae e é comumente utilizado no preparo de xaropes, infusão, tintura e óleo essencial. Além disso, seus extratos são rotineiramente empregados como antioxidantes naturais para aumentar a vida útil de alimentos perecíveis. A planta também é conhecida por ser empregada em medicamentos tradicionais em muitos países. Entre os usos farmacológicos do alecrim estão o antibacteriano, anticancerígeno, antidiabético, anti-inflamatório, antioxidante, antidiurético e efeitos hepatoprotetores. A atividade antioxidante dos extratos de alecrim foi evidenciada em diversos produtos alimentícios. Esta atividade se deve em parte ao AR, cuja eficácia é superior à dos antioxidantes sintéticos utilizados na atualidade. Além do AR, o alecrim possui outros ingredientes ativos como o carnosol e o ácido carnósico (Figura 4) (HARAGUCHI et. al., 1995; ARUOMA et. al., 1996; HABTEMARIAM, 2016).



Figura 4: *Rosmarinus officinalis*

O AR também foi descrito em outras famílias de plantas, como as Blechnaceae (samambaias), Zosteraceae, Potamogetonaceae e Cannaceae. Dentre as espécies vegetais que contém o ácido rosmarínico destacam-se: *Anethum graveolens* (endro), *Artemisia dracuncululus* (estragão), *Betonica*

officinalis (betônica), *Borago officinalis* (borragem), *Glechoma hederacea* (erva-terrestre), *Hyssopus officinalis* (hissopo), *Lavandula angustifolia* (alfazema), *Lycopus europaeus* (licopus), *Majorana hortensis* (manjerona), *Melissa officinalis* (erva cidreira), *Mentha arvensis piperascens* (hortelã), *Mentha pulegium* (poejo), *Mentha spicata* (hortelã-peluda), *Momordica charantia* (melão-de-são-caetano), *Monarda didyma* (bergamota), *Nepeta cataria* (gataria), *Ocimum basilicum* (manjeriço), *Origanum vulgare* (orégano), *Orthosiphon aristatus* (ortosifão), *Petroselinum crispum* (salsinha), *Prunella vulgaris* (brunela), *Rosmarinus officinalis* (alecrim), *Salvia officinalis* (sálvia), *Salvia sclarea* (sálvia-esclaréia), *Salvia sp.*, *Satureja hortensis* (segurelha), *Satureja montana* (segurelha), *Symphytum officinalis* (confrei), *Thymus serpyllum* (serpilho), *Thymus vulgaris* (tomilho) (FECKA; TUREK, 2007; SHE et.al., 2010).

Experimentos em camundongos demonstraram que quando aplicado topicamente, o AR é absorvido e distribuído pela pele, sangue, ossos e músculos. Quando administrado por via intravenosa, distribui-se por vários tecidos, como rins, coração, fígado e baço (RITSCHER et. al., 1989). Ademais, a administração do AR não foi capaz de alterar as enzimas de metabolização de xenobióticos em fígado de camundongos, sugerindo-se que esta substância é metabolizada antes de chegar ao fígado (DEBERSAC et. al., 2001).

Diversas atividades biológicas vêm sendo descritas para essa substância, tais como antiviral, antibacteriana, anti-inflamatória, antioxidante, antimutagênica e neuroprotetora (PETERSEN; SIMMONDS, 2003).

O mecanismo pelo qual o AR exerce atividade antioxidante é provavelmente devido à presença de grupos fenólicos OH, como demonstrado por Rice-Evans (1999). Porém, também foi relatado que a presença de duas estruturas catecol conjugadas com um grupo ácido carboxílico no AR aumentam a sua atividade antioxidante em meio aquoso (DEL BAÑO et. al., 2003). Os hidrogênios fenólicos em combinação com as porções de catecol fornecem a polaridade adequada para que o AR penetre nas bicamadas lipídicas protegendo-as contra a oxidação sem prejudicar a sua estrutura (GIL; ENACHE; OLIVEIRA-BRETT, 2013; FADEL; EL KIRAT; MORANDAT, 2011).

O estresse oxidativo está associado à geração de espécies reativas de oxigênio, tais como O_2^- , OH e H_2O_2 . Isso é geralmente acompanhado pelo

desenvolvimento de doenças crônicas como, por exemplo, a carcinogênese. As enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GSH-Px) são capazes de eliminar as espécies reativas de oxigênio e os produtos da peroxidação lipídica. Entretanto, em um estudo feito em camundongos, o AR produziu um aumento significativo na atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GSH-Px com uma diminuição no biomarcador de estresse oxidativo malondialdeído (MDA), demonstrando que o AR possui um potencial em promover atividade enzimática antioxidante *in vivo* (ZHANG et. al., 2015).

Enzimas ribonucleotídeos redutases também são altamente ativas nos tecidos malignos devido a uma maior necessidade de deoxinucleosídeos trifosfatos (dNTPs) em células de crescimento rápido enquanto apresentam baixa atividade enzimática em células normais de crescimento lento (VOET; VOET; PRATT, 2014). Entretanto, foi relatado que o AR possui hidroxilas livres localizadas nos seus anéis aromáticos que podem ser capazes de remover o radical tirosil/tirosina presente na subunidade R2 do ribonucleotídeo redutase amenizando a sua atividade (SAIKO et. al., 2015).

Ademais, em um estudo sobre o efeito do AR em linhagem de células de leucemia promielocítica HL-60, essa substância foi capaz de remover os radicais livres e diminuir a progressão do ciclo celular devido à significativa inibição da síntese de DNA, bem como de induzir à apoptose (SAIKO et. al., 2015). Em linhagem de células de leucemia humana U937, o AR também sensibilizou a apoptose induzida pelo fator de necrose tumoral (TNF- α) através da supressão da ativação do complexo proteico NF-K β (fator nuclear kappa B) e diminuição da geração de espécies reativas de oxigênio (MOON et. al., 2010).

A capacidade antioxidante do AR também é, em grande parte, responsável pela sua ação neuroprotetora através da inibição das espécies reativas de oxigênio, como os peroxinitritos e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), e fragmentação do DNA. Os peroxinitritos são considerados os responsáveis pela disfunção cognitiva induzida pela proteína β -amilóide (A β) na doença de Alzheimer, entretanto, em um estudo feito em camundongos, o AR reduziu a formação dos peroxinitritos prevenindo a perda de memória provocada pela

neurotoxicidade da proteína A β (CHOI et. al., 2002; QIAO et. al., 2005; ALKAM et. al., 2007).

Com relação às propriedades anti-inflamatórias do AR, acreditam-se que estas sejam baseadas na inibição das enzimas lipoxigenase e ciclooxygenases interferindo com a cascata do sistema complemento (PETERSEN; SIMMONDS, 2003) e regulação das citocinas inflamatórias (SANBONGI et. al., 2003). As citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-6, IL-1 β , TNF- α e certos fatores de crescimento relevantes para a tumorigênese, são potentes ativadores do gene transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 (STAT3). Também tem sido relatado que STAT3 é superexpresso em tumores sólidos (ROSEN et. al., 2006). Resultados de um estudo sobre o efeito do AR em células cancerosas gástricas mostraram que o AR suprimiu essas citocinas de uma forma dose-dependente. Em particular, o AR exerceu um efeito inibidor sobre a via IL-6/ STAT3 (SHUAI et. al., 2015). Este mesmo estudo também demonstrou que o AR inibiu significativamente a expressão de miRNA-155-5p pela inativação da via IL-6/ STAT3. O miR-155 é um microRNA oncogênico que tem sido encontrado superexpresso em vários tipos de tumores sólidos malignos, incluindo câncer de pulmão, carcinomas do sistema digestivo e câncer de mama (LIU et. al., 2012; KIM; JOU; JOE, 2014).

O AR também pode inibir a progressão da aterosclerose, provavelmente, pela regulação do metabolismo lipídico e inibição da reação inflamatória. Um estudo realizado em camundongos deficientes em apolipoproteína E (apoE), proteína plasmática envolvida no metabolismo lipídico, mostrou que essa substância reduziu o nível de colesterol total, triglicerídeos e lipoproteínas de baixa densidade, controlando o aumento da placa aterosclerótica na cavidade aórtica (LI; TIAN; LIANG, 2008).

Estudos *in vitro* e *in vivo* também demonstraram o potencial antineoplásico e quimiopreventivo do AR, modulando vias importantes relacionadas à proliferação, migração celular e quimiorresistência. A bomba de transporte transmembranar glicoproteína-P (Pgp) provoca o efluxo de muitos agentes utilizados na clínica, e acredita-se ser esse um mecanismo importante na resistência ao fármaco em muitos tumores. Entretanto, foi relatado que o extrato de metanol de alecrim inibiu o efluxo dos agentes quimioterápicos

doxorubicina e vimblastina em linhagem de células de mama MCF-7 quimiorresistentes, mas não em MCF-7 de tipo selvagem que não possuem Pgp, indicando que o extrato inibe a ligação dos fármacos à glicoproteína-P (TAI et. al., 2012).

Paluszczak e colaboradores (2010) também demonstraram que em linhagem de células de câncer de mama MCF-7, o AR inibiu a atividade da enzima DNA metiltransferase. A metilação do DNA está relacionada à regulação gênica, memória celular, silenciamento e repressão de pseudo-elementos provenientes de sequências duplicadas. No câncer, o padrão de metilação do DNA sofre alterações fazendo com que uma grande variedade de genes supressores de tumores se transcrevam silenciosamente em promotor, levando à formação de tumores. Assim, a inibição da DNA metiltransferase pode reverter esse efeito e ser de potencial valor terapêutico contra o câncer.

O AR também inibiu a migração óssea de células cancerosas de mama MDAMB-231BO de forma dose-dependente. O AR foi capaz de reduzir a metástase óssea do câncer de mama através da modulação do ligante do receptor do ativador do fator nuclear kappa B (RANKL)/RANK/osteoprotegerina e por suprimir simultaneamente a expressão de interleucina-8 (IL-8) (XU et. al., 2010; LIU; ZHANG, 2015). A osteoprotegerina é um fator pró-angiogênico e sua supressão pode ser benéfica inibindo metástases de células cancerosas (REID; BROWN; HOLEN, 2009). Além disso, níveis elevados de expressão de IL-8 por células de câncer de mama têm sido implicados na redução da massa óssea associada ao CAM metastático (BENDRE et. al., 2003).

Em linhagens de células hepáticas HSC-T6 (ZHANG et. al., 2011) e células de linfoma T humanas (KOLETTAS et. al., 2006) o AR foi capaz de diminuir a proliferação celular e aumentar a apoptose. Em linhagens de carcinoma humano colorretal HCT15 e CO115, o AR também induziu a apoptose, possivelmente, pela inibição da sinalização de ERK (XAVIER et. al., 2009; HOSSAIN et. al., 2014).

Em melanoma, o AR reduziu a formação tumoral modulando as alterações induzidas pela droga imunossupressora 7,12-dimetilbenz(a)antraceno (DMBA) nos marcadores apoptóticos p53, Bcl-2,

caspase-3 e caspase-9 em camundongos albinos (SHARMILA; MANOHARAN, 2012).

Nesse cenário, o AR pode surgir como uma promissora estratégia no tratamento do câncer. Dessa forma, esperamos promover o entendimento acerca das ações do AR nos regimes quimioterapêuticos convencionais.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO CENTRAL

Diante do exposto, o presente projeto de pesquisa teve como objetivo central verificar o efeito antitumoral do ácido rosmarínico em modelos *in vitro* de câncer de prognóstico ruim e com ocorrência elevada de quimiorresistência aos agentes quimioterápicos convencionais. Dentre esses, destacam-se os cânceres de pulmão, de ovário e de mama.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A fim de avaliar a ação citotóxica do ácido rosmarínico nas linhagens, foram delineados os seguintes objetivos específicos:

- Determinação da eficácia antineoplásica do ácido rosmarínico, em monoterapia e em terapia combinada com quimioterápicos convencionais, nas linhagens de NSCLC adenocarcinoma A549 e de grandes células H460, de câncer de mama do subtipo luminal A MCF-7 e do subtipo triplo negativo MDAMB-231 e de câncer de ovário do tipo seroso de alto grau A2780, OVCAR3 e SKOV-3;
- Investigação da ação antitumoral do ácido rosmarínico em concentrações compatíveis com o perfil farmacocinético do composto em humanos, evitando as concentrações elevadas usualmente empregadas nos estudos disponíveis na literatura;
- Avaliação do papel do ácido rosmarínico na formação de colônia;
- Investigação dos mecanismos antineoplásicos do ácido rosmarínico nas linhagens e nas condições experimentais com resultados promissores através da avaliação da expressão de proteínas de autofagia e apoptose envolvidas nos mecanismos de ação do ácido rosmarínico, bem como alterações no ciclo celular.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 LINHAGENS CELULARES E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Foram utilizadas células das linhagens celulares de pulmão A549 e H460, de ovário A2780, OVCAR3 e SKOV-3, e de mama MCF-7 e MDAMB-231. As linhagens de pulmão e ovário foram mantidas em meio RPMI 1640 (Sigma) suplementado com 0,2% de bicarbonato de sódio, e as linhagens de mama foram cultivadas em meio DMEM (Gibco/Invitrogen). Todas as linhagens foram mantidas em meio suplementado com 10% de soro fetal bovino (Vitrocell), 1% de solução estabilizada de Penicilina (100 unidades/mL) e Estreptomicina (100 µg/mL) (Gibco/Invitrogen, Nova York, EUA), 1% Solução Anfotericina B (Sigma) e mantidas em incubação em estufa com condições controladas de temperatura a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂.

4.2 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR METABÓLICA (VCM)

Para avaliação do efeito citotóxico do ácido rosmarínico nas linhagens foi utilizado o método de determinação da viabilidade celular metabólica (VCM) por meio do ensaio de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) (Sigma) (RISS et. al., 2013). As linhagens celulares foram cultivadas em garrafas de 75 cm² até a subconfluência para cada um dos experimentos. Foi retirada uma alíquota de 10 µL para a preparação de uma suspensão na proporção de 1:1 com a solução de Azul de Tripán (v/v) (Gibco/Invitrogen, Nova York, EUA), com fins de quantificação de células viáveis no cultivo, pois esta tem a finalidade de marcar as células que perderam a integridade da membrana. Para a contagem do número de células viáveis, foi utilizada a câmara de Neubauer. Após as células sedimentarem por 2 minutos, a câmara de Neubauer foi levada ao microscópio óptico e a área demarcada foi focalizada com a objetiva de menor aumento. A seguinte fórmula foi usada para o cálculo do número total de células:

$$\text{N}^\circ \text{ de células/mL} = \frac{\text{N}^\circ \text{ total de células}}{\text{N}^\circ \text{ de quadrantes contados (4)}} \times \text{Fator de diluição (2)} \times 10^4$$

O valor encontrado, referente ao número de células por mL, era empregado numa nova equação:

$$\text{Volume final} = \text{Volume inicial} \times \frac{\text{Concentração desejada/mL (10}^5\text{)}}{\text{N}^\circ \text{ de células/mL da suspensão final}}$$

Posteriormente, células de câncer de pulmão, ovário e mama foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 h nas condições padrão de cultivo descritas no item 4.1. Linhagens de pulmão H460 e A549 foram plaqueadas na concentração de 1×10^5 ; de ovário A2780 na concentração de 1×10^4 e SKOV-3 e OVCAR3 em 2×10^4 ; as linhagens de mama MDAMB-231 e MCF-7 foram plaqueadas na concentração de $0,5 \times 10^5$. Após a adesão celular, o meio de cultura foi removido e as células foram tratadas por 48 h e 72 h com o ácido rosmarínico (Sigma-Aldrich, $\geq 98\%$) em monoterapia, em um gradiente de concentração de 10^{-4} M a 10^{-9} M. Nas linhagens e nos tempos em que o tratamento em monoterapia reduziu significativamente a viabilidade celular, foi realizada uma nova incubação e tratamento em politerapia com combinação do ácido rosmarínico com os agentes quimioterápicos convencionais paclitaxel e cisplatina. Para cada uma das drogas, foram realizadas diluições em PBS 1x, no caso da cisplatina, e em DMSO (dimetilsulfóxido) 10% (v/v), no caso do paclitaxel e ácido rosmarínico, a fim de se obter as concentrações desejadas. Após os tempos de tratamentos de 48h e 72h, os ensaios foram incubados em solução de MTT (concentração final 0,5 mg/mL) por 4h. Os cristais de tetrazólio formados foram dissolvidos em 100 μ L de DMSO (P.A.) e a densidade óptica avaliada em 540 nm. Como controle negativo, utilizou-se o excipiente (PBS ou DMSO 2%) em volume igual ao volume de droga utilizado. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.3 CÁLCULO DO IC₅₀ ESTIMADO DAS DROGAS TESTADAS

O cálculo estimado dos valores da concentração inibitória de 50% da proliferação celular (IC₅₀) foi realizado a partir da curva dose-resposta de cada droga, obtida através do Ensaio de Viabilidade Celular Metabólica descrito acima. Os valores de IC₅₀ foram usados para comparação das potências entre as substâncias testadas. Para o cálculo da IC₅₀ utilizou-se o software GraphPadPrism versão 5.0.

4.4 ENSAIO DE FORMAÇÃO DE COLÔNIA

Para analisar a capacidade proliferativa das células de formarem colônias após exposição aos agentes antiproliferativos, foi utilizado o ensaio de sobrevivência clonogênica (PLUMB, 2004). Brevemente, 200 e 850 células por poço das linhagens MCF-7 e MDAMB-231, respectivamente, foram semeadas em placas de 12 poços. Após 24 h de aderência, as células foram tratadas em monoterapia com ácido rosmarínico e em associação com ácido rosmarínico e paclitaxel, por 72 h. Após o período de tratamento, as células foram lavadas com solução de PBS para retirada dos agentes antineoplásicos e, em seguida, foi adicionado aos poços meio de cultura celular. Posteriormente, as células foram incubadas por aproximadamente 10 dias, sendo as culturas observadas diariamente com o auxílio de microscópio invertido. Ao final do período de incubação, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas com PBS e fixadas com formaldeído 4% (p/v). As células foram coradas com cristal violeta 0,1% (p/v) diluído em solução salina. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.5 ENSAIO DE CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO

As fases do ciclo celular podem ser caracterizadas por variações no seu conteúdo de DNA que, quando analisado por citometria de fluxo após marcação com iodeto de propídeo, permite quantificar a porcentagem de células em cada fase do ciclo. O efeito do ácido rosmarínico em monoterapia e em associação ao paclitaxel foi avaliado nas diferentes fases do ciclo celular.

Brevemente, células da linhagem celular MDAMB-231 foram semeadas na densidade de $0,2 \times 10^6$ cel/ml em placas de 12 poços e, após o período de adesão celular, foram tratadas com AR e paclitaxel em monoterapia e politerapia. Após 72h de tratamento, as células foram tripsinizadas, centrifugadas por 7 min a 1800rpm e o pellet lavado duas vezes com PBS. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 150 μ L de PBS e fixadas com 1350 μ L de etanol 70%. Depois de fixar por pelo menos 30 min a 4°C, a amostra foi centrifugada por 5 minutos a 1800rpm, o pellet ressuspensado em 1 mL de PBS e feita a contagem das células (até que tivessem entre 50 e 200 cel/ μ L). Foi retirado o volume necessário e centrifugado por 5 min a 1800rpm. Em seguida, o pellet foi ressuspensado em tampão de permeabilização (Tris-HCl 3,4 mM, pH 7,6, NaCl 10 mM, NP40 0,1% (v/v), RNase 700 U/L e PI 0,075 mM (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) e as amostras foram incubadas por 15 minutos no gelo, protegidas da luz.

A leitura foi realizada no citômetro FACSCanto II (BD) utilizando o canal FL-2 (585nm). Um total de 10.000 eventos (células) foi adquirido por amostra e os dados analisados pelo software Summit v.4.3. Os experimentos foram realizados em duplicata.

4.6 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

As células das linhagens de mama, MCF-7 e MDAMB-231, foram plaqueadas na densidade de $0,2 \times 10^6$ células/mL em placas de 12 poços em meio DMEM suplementado sob as condições de cultivo padrão citados no item 4.1. Após 24 h de aderência, as células foram tratadas por 72h com ácido rosmarínico e paclitaxel, em monoterapia, e paclitaxel e ácido rosmarínico em politerapia.

Para extração de proteínas, as células primeiramente foram lavadas com PBS para remoção do excesso de meio de cultivo e removidas com auxílio de um mini-rodó e tampão de extração RIPA (Tris-HCL pH 7,4 50 mM, NaCl 150mM, 1% Triton 100X, 0,5% Deoxicolato de sódio e SDS 0,1%) adicionado de inibidores de fosfatase e proteases (SIGMA) (CAO et. al., 2005). As amostras foram incubadas por 30 min em gelo e, em seguida, centrifugadas a 9000 g por 30 min

a 4 °C. O sobrenadante correspondente às proteínas totais foi armazenado a -80 °C para posterior utilização. A dosagem das proteínas foi realizada pelo método de Bradford (SIGMA) (BRADFORD, 1976), em triplicata. A curva padrão foi construída utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão nas concentrações 0,5; 1,0; 2,0; 4 e 8 e 16 µg/µL, em microplaca de 96 poços. Para o ensaio foram adicionados, em cada poço, 20 µL da proteína e água e 180 µL do Reagente de Bradford. A placa foi mantida em temperatura ambiente por 10 min e a leitura realizada em Leitor de Elisa (Bio-Rad) em absorvância 595 nm.

4.7 IMUNOBLLOT

A expressão de proteínas envolvidas nas vias de sinalização PI3K/AKT/mTOR, proteínas relacionadas à morte celular por apoptose e autofagia, foram analisadas em linhagens celulares de mama MCF-7 e MDAMB-231 tratadas com ácido rosmarínico em monoterapia e politerapia com o quimioterápico paclitaxel pela técnica de *Imunoblot*.

O perfil das proteínas totais foi resolvido por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida a 10% (LAEMMLI, 1970). Posteriormente, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Trans-*Blot*® Bio-Rad) a 200mA por 2h, no gelo, em tampão de transferência (25 mM Tris; 192 mM glicina; metanol 20%) utilizando o sistema de transferência BIORAD. Após a transferência, as membranas foram incubadas em solução de bloqueio TBS-T (Tris-HCl 100 mM; NaCl 1,5 M pH 7,5 e 0,05% Tween 20) acrescido de leite em pó desnatado 5% por 1h a temperatura ambiente e, posteriormente, lavadas 3 vezes com TBS-T por 15 minutos. Em seguida, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários (Quadro 1) a 4 °C por 16h e, posteriormente, lavadas três vezes com TBS-T por 15 minutos. As membranas foram incubadas com os anticorpos secundários conjugados anti-IgG produzidos em coelho ou camundongo marcados com peroxidase (GE) (1:5000) por 2h em temperatura ambiente. Os anticorpos utilizados foram diluídos em TBS-T acrescido de leite em pó desnatado 0,5%.

As membranas foram reveladas por quimioluminescência utilizando o kit *ECL Plus Western Blotting Detection Reagents* (Amersham), de acordo com o protocolo do fabricante. As membranas foram normalizadas utilizando os

anticorpos monoclonais primários anti- α -actina ou anti-GAPDH produzidos em coelho e o anticorpo secundário conjugado anti-IgG de coelho marcado com peroxidase (1:5000) (GE). As imagens foram analisadas utilizando o software ImageLab (Biorad).

Anticorpos	Diluição
LC3	1:200
BAX	1:500
P62	1:200
GAPDH	1:5000
ACTINA	1:5000

Quadro 1: Descrição dos anticorpos primários utilizados nos experimentos de análise da expressão proteica.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram efetuadas usando o Teste ANOVA de duas vias e, em seguida, utilizou-se o Teste de Comparação Múltipla de Bonferroni. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. O programa usado para os cálculos estatísticos foi o GraphPAd Prism 5 para Windows (versão 5.00.288).

O programa CompuSyn foi usado para avaliar as interações entre as drogas. Nesta análise, sinergismo, efeito aditivo e antagonismo são definidos como índice de combinação (CI) < 1 , CI = 1, e CI > 1 , respectivamente (CHOU, 2010).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ÁCIDO ROSMARÍNICO NÃO INIBE A VIABILIDADE CELULAR METABÓLICA EM LINHAGENS DE CÂNCER DE PULMÃO

Inicialmente, procedemos com os experimentos de proliferação celular a fim de calcular as porcentagens da viabilidade celular metabólica (VCM (%)) resultante do tratamento das células de CP com o AR, conforme verificado em ensaio de MTT, utilizando o grupo das células não tratadas cultivadas apenas em RPMI como controle. Os experimentos foram realizados nos tempos de 48h e 72h.

Entretanto, observamos que não houve eficácia antiproliferativa do AR nas concentrações avaliadas da substância, que estavam entre 10^{-4} a 10^{-9} M (100 μ M a 0,001 μ M), na linhagem de CP de grandes células H460 tanto no tempo de 48h quanto em 72h. As análises também foram feitas na linhagem de NSCLC adenocarcinoma A549 nas mesmas condições experimentais de tempo e concentração e igualmente não houve efeito citotóxico significativo do AR (Figura 5 e 6).

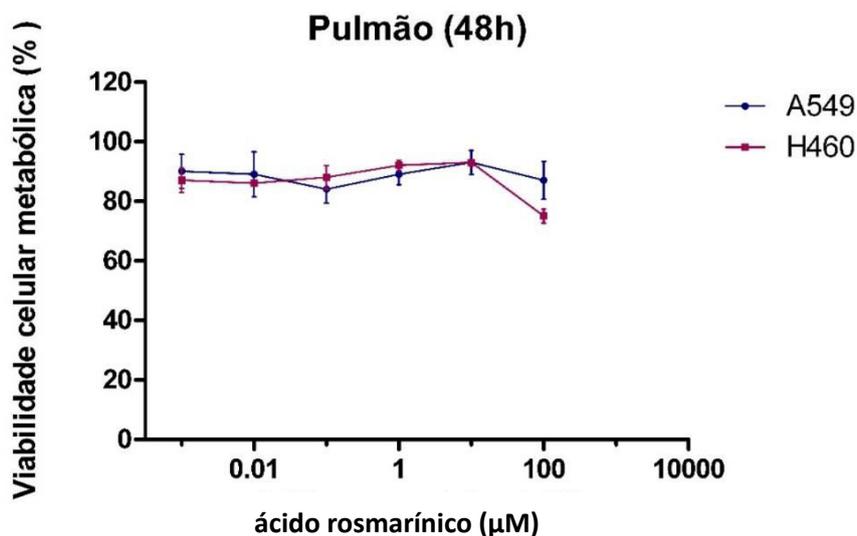


Figura 5: Viabilidade celular metabólica das linhagens de pulmão A549 e H460 após tratamento com ácido rosmarínico por 48h.

O ensaio foi avaliado pelo método de MTT. Células não tratadas, cultivadas em meio RPMI, foram utilizadas como controle. Os dados foram analisados pelo teste ANOVA de duas vias com *post test* de Bonferroni. Os resultados representam a média e desvio padrão de (\geq) 3 experimentos independentes. $F_{(5; 24)} = 0,9004$.

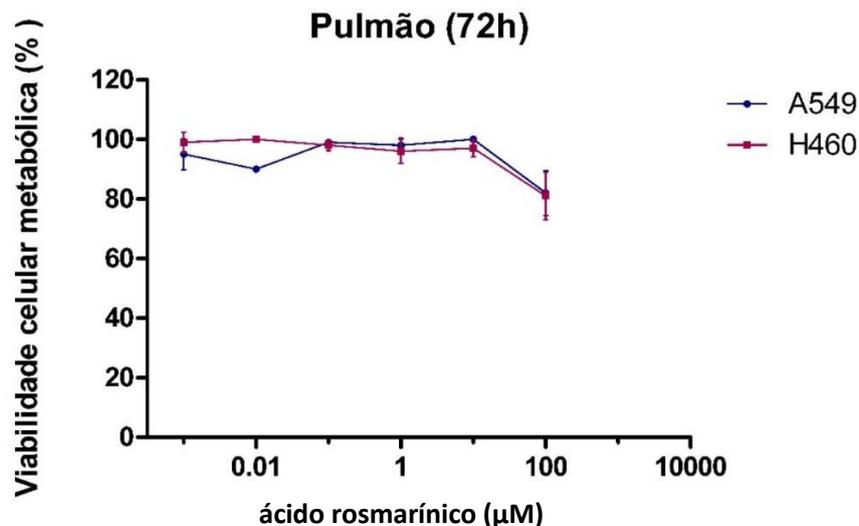


Figura 6: Viabilidade celular metabólica das linhagens de pulmão A549 e H460 após tratamento com ácido rosmarínico por 72h.

O ensaio foi avaliado pelo método de MTT. Células não tratadas, cultivadas em meio RPMI, foram utilizadas como controle. Os dados foram analisados pelo teste ANOVA de duas vias com *post test* de Bonferroni. Os resultados representam a média e desvio padrão de (\geq) 3 experimentos independentes. $F_{(5; 24)} = 0,7598$.

Rosmarinus officinalis tem sido descrito por apresentar propriedades antioxidante, anti-inflamatória e antineoplásica. O extrato de alecrim possui altas concentrações de polifenóis como o AR e o ácido carnósico (OKAMURA et. al., 1994). Em um estudo sobre o efeito antiproliferativo do extrato de alecrim em linhagem de adenocarcinoma A549 observou-se uma significativa inibição da proliferação celular com a concentração do extrato a 50 µg/mL. Este efeito foi similar ao efeito de 100 µM do antioxidante natural encontrado em uvas pretas e vinho tinto, resveratrol (MOORE et. al., 2016).

Em carcinoma de pequenas células NCI-H82, a mesma concentração do extrato (50 µg/mL) também reduziu a viabilidade celular (YESIL-CELIK TAS et. al., 2010). Entretanto, a diminuição da proliferação pode ser devida, principalmente, à presença do composto fenólico ácido carnósico. Nesse mesmo estudo, essa substância provocou a menor viabilidade celular com valores variando de 13 a 30% a uma concentração de 6,25 µg/mL (18,8 µM) após 48h de tratamento, enquanto o ácido rosmarínico mostrou quase nenhum efeito inibitório a uma concentração de 50 µg/mL (139 µM) com valores de 98% de VCM.

Em estudo realizado por Tao e colaboradores, em linhagem de NSCLC

A549, o AR reduziu o crescimento celular, entretanto, com elevado valor de IC_{50} de 198,12 μ M, o que foi relacionado à diminuição da atividade da enzima COX-2, sugerindo um papel anti-inflamatório do ácido rosmarínico (2014).

Em estudo *in vivo*, ratos portadores de carcinoma pulmonar tratados com 2 mg/Kg de AR obtiveram 56,83% de inibição tumoral e 59,53% de inibição na formação de metástase. Entretanto, a administração de 4mg/Kg de AR provocou uma perda de peso, sugerindo citotoxicidade. Assim, os resultados demonstraram que uma concentração de 2 mg/Kg poderia suprimir o crescimento tumoral sem efeito adverso (XU Y. et. al., 2010).

Portanto, em nossos estudos, observamos que nas linhagens de CP A549 e H460 não houve eficácia antiproliferativa do AR nas concentrações avaliadas (100 μ M a 0,001 μ M), tanto no tempo de 48h quanto em 72h.

5.2 EFEITO DO ÁCIDO ROSMARÍNICO NA VIABILIDADE CELULAR METABÓLICA EM LINHAGENS DE CÂNCER DE OVÁRIO

Posteriormente, realizamos os experimentos de proliferação celular a fim de calcular as porcentagens da VCM resultante do tratamento com o ácido rosmarínico nas linhagens de CAO V A2780, SKOV-3 e OVCAR3, conforme verificado em ensaio de MTT. Os experimentos foram realizados no tempo de 48h e nas concentrações do AR de 10^{-4} a 10^{-9} M. Entretanto, observamos que não houve eficácia antiproliferativa do AR nas linhagens e nas concentrações avaliadas no tempo de tratamento de 48h (Figura 7).

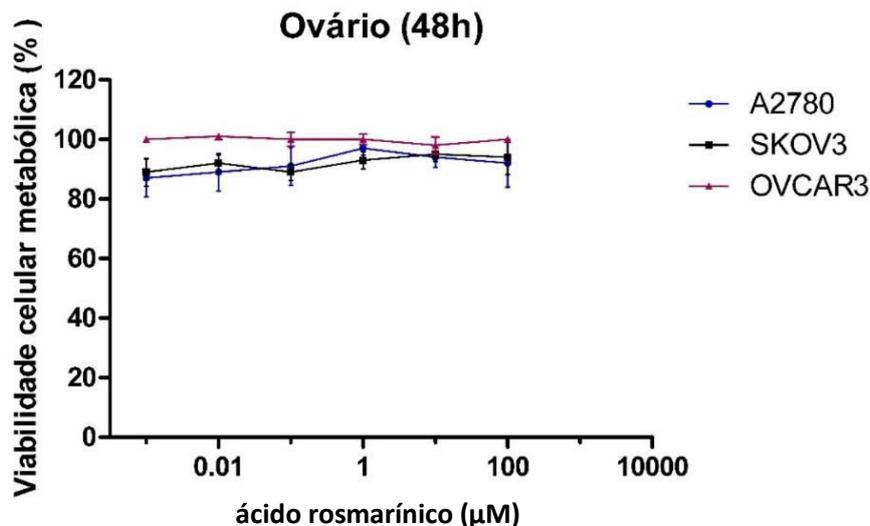


Figura 7: Viabilidade celular metabólica das linhagens de ovário A2780, SKOV3 e OVCAR3 após tratamento com ácido rosmarínico por 48h.

O ensaio foi avaliado pelo método de MTT. Células não tratadas, cultivadas em meio RPMI, foram utilizadas como controle. Os dados foram analisados pelo teste ANOVA de duas vias com *post test* de Bonferroni. Os resultados representam a média e desvio padrão de (\geq) 3 experimentos independentes. $F_{(10; 36)} = 0,3303$.

Em seguida, procedemos com os experimentos nas linhagens supracitadas nas mesmas condições experimentais de concentração, porém no tempo de tratamento de 72h. Verificamos que não houve inibição na proliferação celular na linhagem de ovário quimiorresistente OVCAR3. No entanto, nas linhagens de CAOV A2780 e SKOV-3, o AR sensibilizou as células com redução na viabilidade celular de 90% e 54%, respectivamente, na maior concentração de 10^{-4} M (100 µM) (Figura 8).

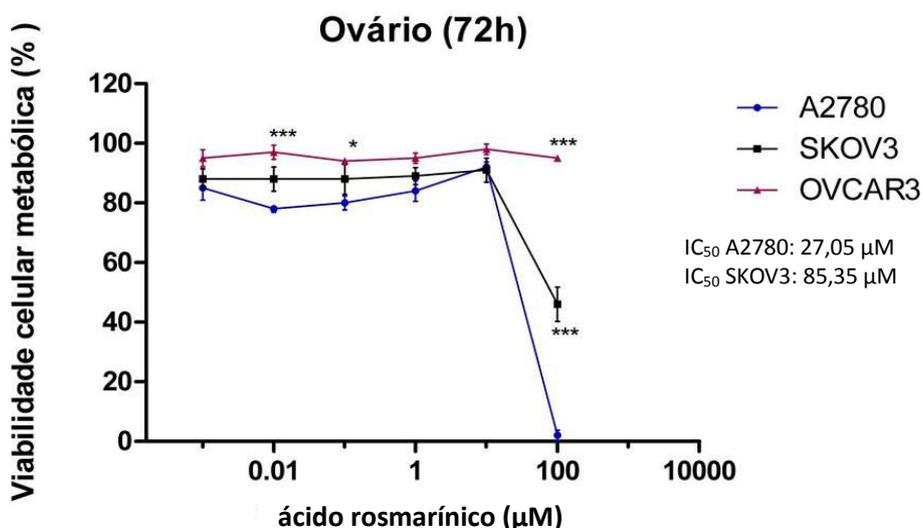


Figura 8: Viabilidade celular metabólica das linhagens de ovário A2780, SKOV3 e OVCAR3 após tratamento com ácido rosmarínico por 72h.

O ensaio foi avaliado pelo método de MTT. Células não tratadas, cultivadas em meio RPMI, foram utilizadas como controle. Os dados foram analisados pelo teste ANOVA de duas vias com *post test* de Bonferroni. Os resultados representam a média e desvio padrão de (\geq) 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. A interação foi estatisticamente significativa com valor de $F_{(10; 36)} = 28,67$.

Logo após, avaliamos se a combinação do AR com um quimioterápico convencional, cisplatina, seria capaz de sensibilizar a linhagem quimiorresistente de ovário seroso de alto grau OVCAR3. Para isso, combinamos a IC_{50} estimada do AR (1,8 mM) com a curva padrão da OVCAR3 e cisplatina que variou entre 50 μ M a 0,195 μ M. Entretanto, o AR não potencializou o efeito do quimioterápico cisplatina na linhagem no tempo de 72h. A associação ainda promoveu um leve efeito de antagonismo com índice de combinação igual a 1,68 (Figura 9).

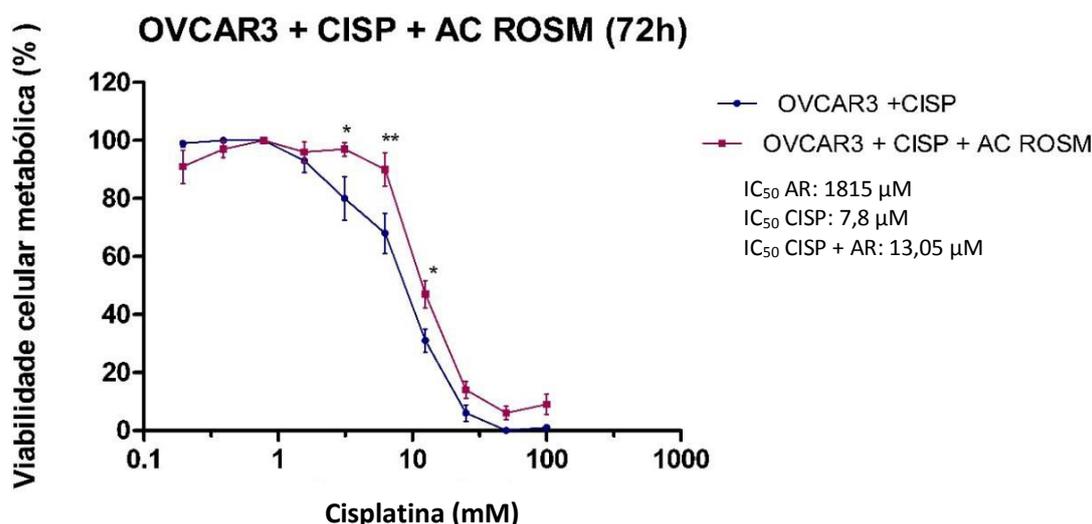


Figura 9: Viabilidade celular metabólica da linhagem de ovário OVCAR3 após tratamento com ácido rosmarínico e cisplatina por 72h.

O ensaio foi avaliado pelo método de MTT. Células não tratadas, cultivadas em meio RPMI, foram utilizadas como controle. Os dados foram analisados pelo teste ANOVA de duas vias com *post test* de Bonferroni. Os resultados representam a média e desvio padrão de (\geq) 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. A interação foi estatisticamente significativa com valor de $F_{(9; 40)} = 3,097$.

O CAOV é uma doença com alta mortalidade em mulheres, sendo o principal problema a recorrência de células resistentes aos fármacos após a quimioterapia. A cisplatina é o agente quimioterápico de primeira escolha neste tipo de tumor, entretanto a sua elevada toxicidade limita a dosagem a ser utilizada (ARAÚJO, 2008). O alecrim é uma popular erva medicinal e estudos recentes têm relatado suas atividades farmacológicas na quimioprevenção e na

terapia do câncer (CHEUNG; TAI, 2007).

Tai e colaboradores (2012) observaram que o extrato dessa planta mostrou efeito antiproliferativo dose-dependente em linhagem de CAOV A2780 e A2780CP70 resistentes à cisplatina. Entretanto, as células A2780 foram significativamente mais sensíveis ao extrato do que a linhagem A2780 quimiorresistente. Neste estudo, o AR reduziu a viabilidade da linhagem A2780 com um valor de IC_{50} de 139 μ M em 48h. Ademais, 27,8 μ M do AR potencializou significativamente a atividade antiproliferativa da cisplatina nesta linhagem inibindo a proliferação celular em 85%. No entanto, na linhagem resistente A2780CP70 não foi observada atividade antiproliferativa nessa mesma concentração (139 μ M) e também não houve aumento da atividade do quimioterápico padrão.

5.3 EFEITO DO ÁCIDO ROSMARÍNICO NA VIABILIDADE CELULAR METABÓLICA EM LINHAGENS DE CÂNCER DE MAMA

Em seguida, prosseguimos com a triagem pelo método de MTT com o objetivo de determinarmos a eficácia citotóxica e a IC_{50} estimada do AR nas linhagens de CAM do tipo luminal A MCF-7 e de TNBC MDAMB-231 nos tempos de 48h e 72h.

Em 48h de tratamento a inibição da VCM esteve em torno de 26% e 11% nas linhagens MCF-7 e MDAMB-231, respectivamente, quando expostas à maior concentração do AR (100 μ M), apresentando pouco efeito citotóxico quando comparado ao tempo de 72h.

Neste tempo de tratamento, 72h, a linhagem MCF-7 na concentração de 100 μ M do AR apresentou uma significativa redução de 82% da viabilidade celular, enquanto a linhagem TNBC MDAMB-231 apresentou uma diminuição de 74% de células viáveis (Figura 10 e 11).

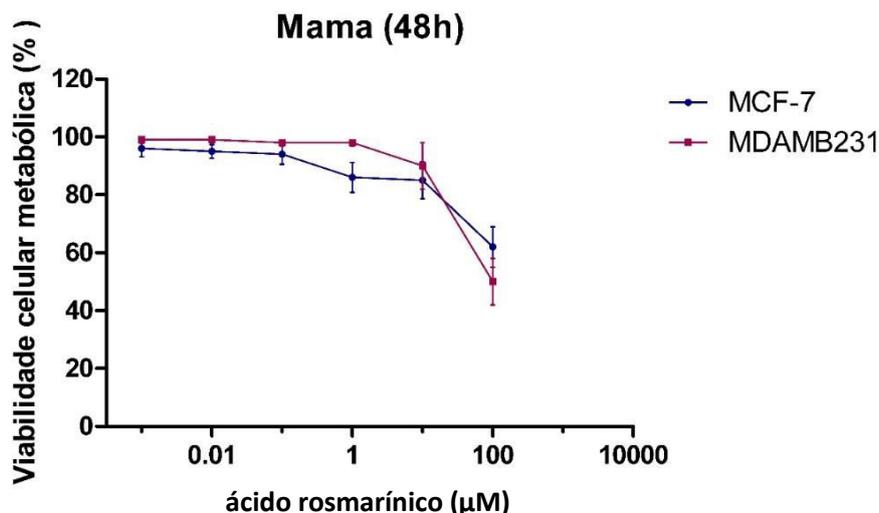


Figura 10: Viabilidade celular metabólica das linhagens MCF-7 e MDAMB231 após tratamento com ácido rosmarínico por 48h.

O ensaio foi avaliado pelo método de MTT. Células não tratadas, cultivadas em meio DMEM, foram utilizadas como controle. Os dados foram analisados pelo teste ANOVA de duas vias com *post test* de Bonferroni. Os resultados representam a média e desvio padrão de (\geq) 3 experimentos independentes. $F_{(5; 24)} = 1,354$.

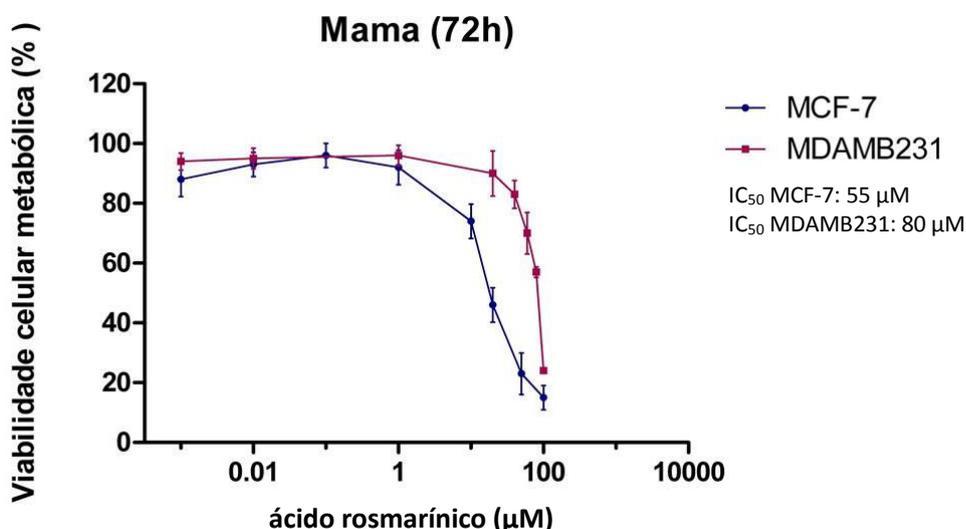


Figura 11: Viabilidade celular metabólica das linhagens MCF-7 e MDAMB231 após tratamento com ácido rosmarínico por 72h.

O ensaio foi avaliado pelo método de MTT. Células não tratadas, cultivadas em meio DMEM, foram utilizadas como controle. Os dados foram analisados pelo teste ANOVA de duas vias com *post test* de Bonferroni. Os resultados representam a média e desvio padrão de (\geq) 3 experimentos independentes. $F_{(7; 32)} = 6,624$.

A partir dos dados obtidos no ensaio de VCM, o valor da IC_{50} do AR para cada linhagem avaliada foi calculado pelo *software* GraphPad Prism. No subtipo luminal A MCF-7 o AR apresentou valor estimado de IC_{50} de 55 μ M e de 80 μ M

no subtipo triplo negativo MDAMB-231, no tempo de tratamento de 72h (Quadro 2).

Droga	MCF-7 IC₅₀ (M)	MDAMB-231 IC₅₀ (M)
Cisplatina	6,9x10 ⁻⁶	4x10 ⁻⁶
Paclitaxel	3,8x10 ⁻¹⁰	7,4x10 ⁻⁹
Ácido Rosmarínico	5,5x10 ⁻⁵	8x10 ⁻⁵

Quadro 2: IC₅₀ estimada para as linhagens de CAM MCF-7 e MDAMB-231 em 72h

O método MTT constitui ferramenta útil com fins à determinação da potência e eficácia das drogas quanto às suas atividades antiproliferativas, embora haja limitação do método em fornecer valores exatos de concentração para o parâmetro farmacocinético de IC₅₀.

Posteriormente, a fim de analisar se o AR poderia potencializar o efeito antiproliferativo dos quimioterápicos padrão nas linhagens de CAM, combinamos o AR com os agentes cisplatina e paclitaxel.

O tratamento combinado de 55 µM do AR potencializou o efeito citotóxico do quimioterápico padrão cisplatina na linhagem do tipo luminal A MCF-7 até nas menores concentrações deste que variou entre 0,08 mM e 0,000064 mM. A associação do AR com a cisplatina trouxe benefícios ao regime terapêutico ao reduzir significativamente a IC₅₀ do quimioterápico. A combinação produziu efeito sinérgico com índice de combinação (CI) = 0,0125 (Figura 12).

A combinação do AR na concentração de 55 µM também potencializou o quimioterápico paclitaxel, na linhagem MCF-7, com a IC₅₀ deste sendo consideravelmente reduzida. O efeito benéfico foi observado em todas as concentrações do agente antineoplásico padrão que variou entre 5 µM e 0,000001 µM. A associação do AR com o paclitaxel promoveu efeito de sinergismo com CI = 0,0192 (Figura 13).

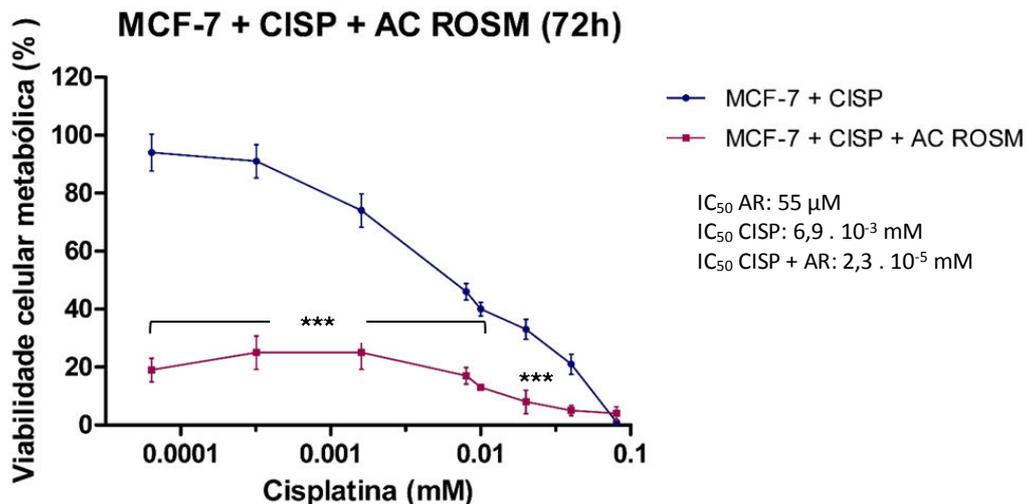


Figura 12: Estudo da viabilidade celular metabólica (VCM) da linhagem MCF-7 após tratamento com ácido rosmarínico e cisplatina por 72h.

O ensaio foi avaliado pelo método de MTT. Células não tratadas, cultivadas em meio DMEM, foram utilizadas como controle. Os dados foram analisados pelo teste ANOVA de duas vias com *post test* de Bonferroni. Os resultados representam a média e desvio padrão de (\geq) 3 experimentos independentes. *** $p < 0,001$. A interação foi estatisticamente significativa com valor de $F_{(7; 32)} = 20,84$.

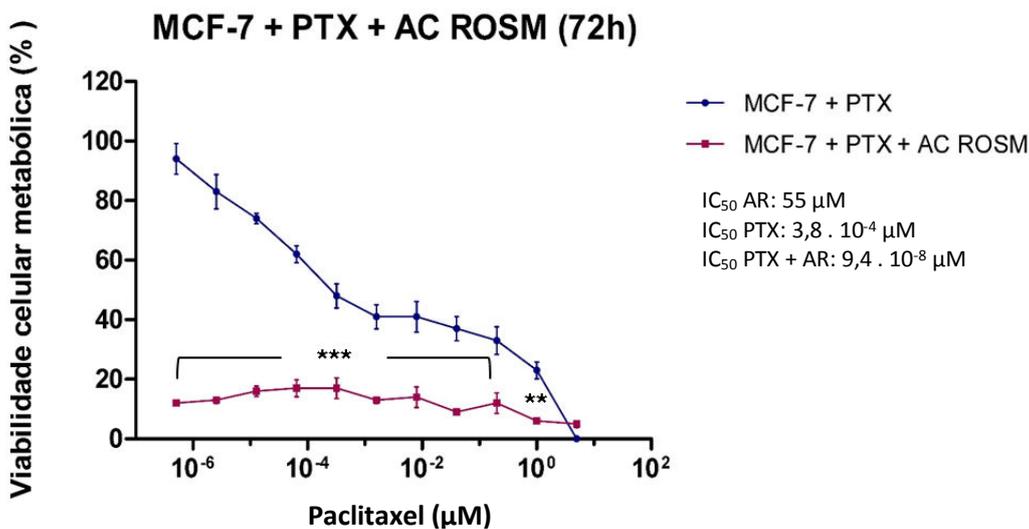


Figura 13: Viabilidade celular metabólica da linhagem MCF-7 após tratamento com ácido rosmarínico e paclitaxel por 72h.

O ensaio foi avaliado pelo método de MTT. Células não tratadas, cultivadas em meio DMEM, foram utilizadas como controle. Os dados foram analisados pelo teste ANOVA de duas vias com *post test* de Bonferroni. Os resultados representam a média e desvio padrão de (\geq) 3 experimentos independentes. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. A interação foi estatisticamente significativa com valor de $F_{(10; 44)} = 30,34$.

Semelhante à linhagem MCF-7, a associação do AR com o quimioterápico cisplatina reduziu significativamente a IC_{50} deste na linhagem

TNBC MDAMB-231, em 72h de tratamento. Na combinação, a viabilidade celular também foi reduzida em mais de 80% em todas as concentrações do quimioterápico que variou entre 0,04 mM e 0,000625 mM. A concentração administrada do AR foi de 80 μ M, que corresponde ao IC₅₀ do mesmo para esta linhagem. O sinergismo foi comprovado através da análise do índice de combinação cujo valor foi de 0,00369 (Figura 14).

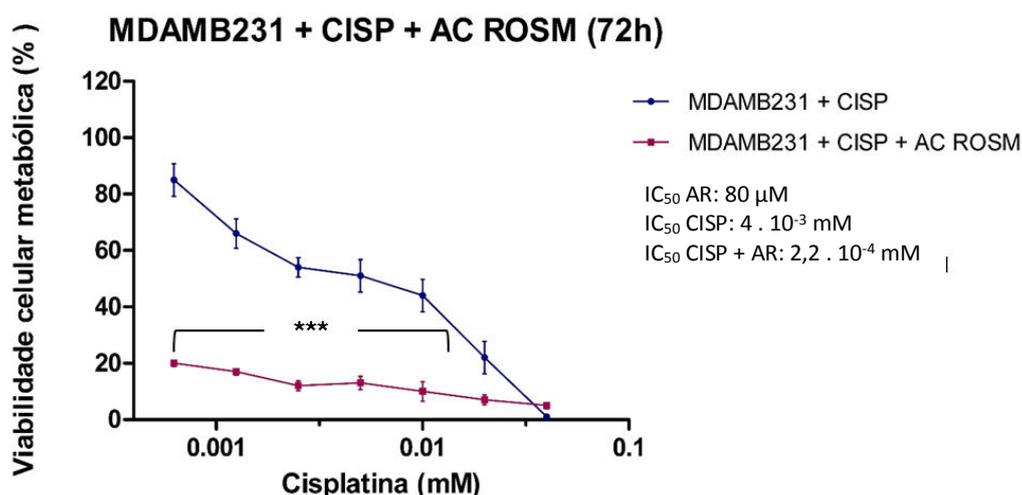


Figura 14: Viabilidade celular metabólica da linhagem MDAMB231 após tratamento com ácido rosmarínico e cisplatina por 72h.

O ensaio foi avaliado pelo método de MTT. Células não tratadas, cultivadas em meio DMEM, foram utilizadas como controle. Os dados foram analisados pelo teste ANOVA de duas vias com *post test* de Bonferroni. Os resultados representam a média e desvio padrão de (\geq) 3 experimentos independentes. *** $p < 0,001$. A interação foi estatisticamente significativa com valor de $F_{(6, 28)} = 17,91$.

Na combinação de 80 μ M do AR com o paclitaxel, a viabilidade celular da linhagem MDAMB-231 também foi reduzida em mais de 80% em todas as concentrações do mesmo (5 μ M a 0,000013 μ M). A IC₅₀ do quimioterápico também foi significativamente reduzida, indicando que a associação com o AR pode diminuir substancialmente a dose do quimioterápico a ser administrada. A associação do AR com o paclitaxel promoveu efeito sinérgico com CI = 0,0026 (Figura 15).

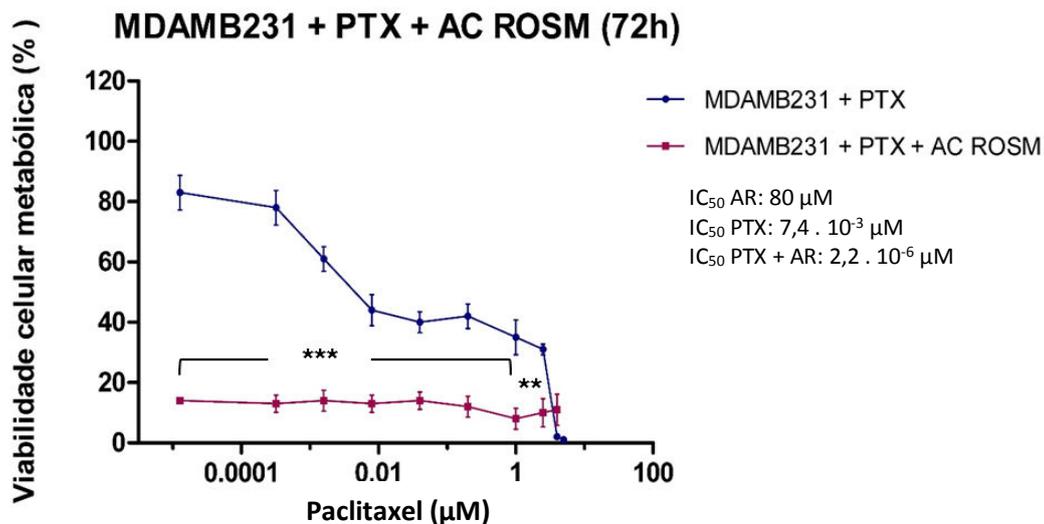


Figura 15: Viabilidade celular metabólica da linhagem MDAMB231 após tratamento com ácido rosmarínico e paclitaxel por 72h.

O ensaio foi avaliado pelo método de MTT. Células não tratadas, cultivadas em meio DMEM, foram utilizadas como controle. Os dados foram analisados pelo teste ANOVA de duas vias com *post test* de Bonferroni. Os resultados representam a média e desvio padrão de (\geq) 3 experimentos independentes. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. A interação foi estatisticamente significativa com valor de $F_{(9; 40)} = 22,62$.

Em seguida, um breve resumo da IC₅₀ do AR e dos agentes cisplatina e paclitaxel nas linhagens de CAM em monoterapia e em politerapia, no tempo de tratamento de 72h (Quadro 3):

Linhasgens	Condições Experimentais	IC ₅₀
MCF-7	Cisplatina	$6,9 \times 10^{-3}$ mM
	Cisplatina + 55 μM Ácido Rosmarínico	$2,3 \times 10^{-5}$ mM
	Paclitaxel	$3,8 \times 10^{-4}$ μM
	Paclitaxel + 55 μM Ácido Rosmarínico	$9,4 \times 10^{-8}$ μM
MDAMB-231	Cisplatina	4×10^{-3} mM
	Cisplatina + 80 μM Ácido Rosmarínico	$2,2 \times 10^{-4}$ mM
	Paclitaxel	$7,4 \times 10^{-3}$ μM
	Paclitaxel + 80 μM Ácido Rosmarínico	$2,2 \times 10^{-6}$ μM

Quadro 3: valor da IC₅₀ estimada para os agentes cisplatina e paclitaxel em monoterapia e em associação com o AR nas linhagens MCF-7 e MDAMB-231, em 72h.

Assim, os valores da IC₅₀ e os resultados de citotoxicidade obtidos através do ensaio de MTT nas linhagens de CAM MCF-7 e MDAMB-231, em

72h, apontam que o AR pode ser um promissor agente citotóxico tanto em monoterapia quanto em terapia combinada.

O resultado encontrado foi corroborado por Yesil-Celiktas e colaboradores (2010) que observaram que o AR promoveu redução do crescimento celular das linhagens MCF-7 e MDAMB-231 na concentração de 138,8 μM em 48h.

Berdowska e colaboradores (2013) também observaram que em linhagem MCF-7 resistente à doxorrubicina, o AR apresentou um potente efeito citotóxico aumentando a atividade antiproliferativa do quimioterápico e reduzindo a proliferação celular em 86%.

Além disso, Moon e colaboradores (2010) verificaram que 60 μM do AR diminuiu a viabilidade celular da linhagem MCF-7 quando combinado ao fator de necrose tumoral TNF- α indicando que o AR estimula a apoptose induzida pelo TNF- α . Embora o TNF- α seja útil na terapia anti-câncer, ele também é responsável por induzir uma resposta inflamatória profunda através da ativação do NFkB. O fator nuclear Kappa B compreende um complexo de fatores de transcrição que regulam vários processos celulares e que tem sido relatado ter um papel na iniciação, desenvolvimento, metástase e resistência ao tratamento do câncer. Muitos tumores têm atividade devido ao microambiente inflamatório e às mutações oncogênicas causados pelo NFkB. Assim, muitas células tumorais são resistentes ao TNF- α devido, principalmente, à ativação do fator nuclear Kappa B (XIA; SHEN; VERMA, 2014). Entretanto, foi observado que o AR diminui a ativação do NFkB em fibroblastos dérmicos humanos (LEE et. al., 2006).

5.4 EFEITO DO ÁCIDO ROSMARÍNICO NA FORMAÇÃO DE COLÔNIAS EM LINHAGENS CELULARES DE CÂNCER DE MAMA

O ensaio de clonogenicidade ou de formação de colônias é um ensaio de sobrevivência celular que permite a avaliação da viabilidade reprodutiva, ou seja, a capacidade de uma única célula para formar uma colônia. O ensaio testa todas as células da população por sua capacidade de sofrer uma divisão ilimitada (FRANKEN et. al., 2006).

Nesse contexto, o AR foi capaz de inibir completamente a formação de colônias na linhagem MCF-7, tanto em monoterapia quanto em terapia combinada com paclitaxel, em todas as concentrações testadas. Entretanto, o paclitaxel utilizado em monoterapia não foi capaz de diminuir a formação de colônias quando comparado ao controle (Figura 16).

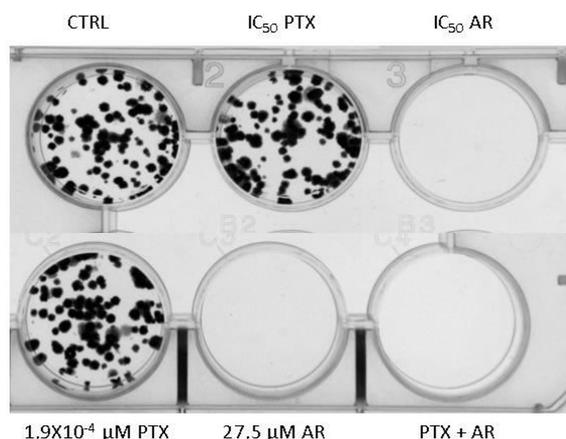


Figura 16: Ensaio de formação de colônia na linhagem MCF-7. Células da linhagem MCF-7 foram semeadas em placas de 12 poços e tratadas com AR e PTX na concentração da IC_{50} e na metade desta, em monoterapia e em associação. Os experimentos foram acompanhados por 12 dias. Figura representativa de um experimento.

Na linhagem MDAMB-231, as concentrações utilizadas do AR também inibiram totalmente a formação de colônias em monoterapia e em politerapia com paclitaxel. Observou-se ainda que o tratamento com o quimioterápico paclitaxel em monoterapia reduziu drasticamente a formação de colônia, principalmente quando na concentração da IC_{50} (Figura 17).

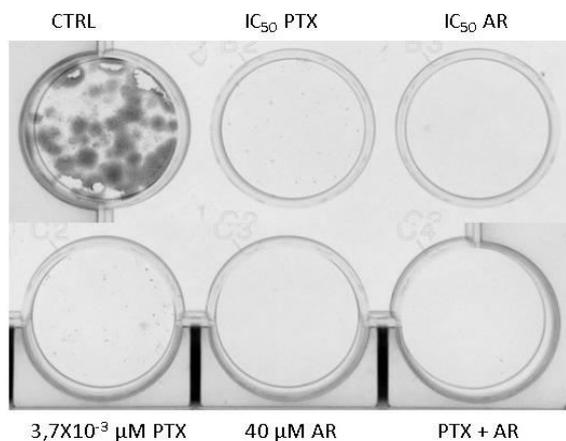


Figura 17: Ensaio de formação de colônia na linhagem MDAMB-231. Células da linhagem MDAMB-231 foram semeadas em placas de 12 poços e tratadas com AR e

PTX na concentração da IC_{50} e na metade desta, em monoterapia e em associação. Os experimentos foram acompanhados por 10 dias. Figura representativa de um experimento.

5.5 EFEITO DO ÁCIDO ROSMARÍNICO NAS ALTERAÇÕES DO CICLO CELULAR NAS LINHAGENS DE CÂNCER DE MAMA

A fim de verificar se o AR interfere no ciclo celular da linhagem de CAM triplo negativo MDAMB-231, realizamos ensaio utilizando marcação com o intercalante de DNA PI (iodeto de propídeo). As células foram tratadas por 72h com o AR em monoterapia e em terapia combinada com o quimioterápico paclitaxel. O paclitaxel também foi utilizado como droga controle, pois atua estabilizando os microtúbulos o que provoca a desestabilização do fuso mitótico induzindo, assim, o bloqueio do ciclo celular na fase G2/M e resultando em apoptose celular (JORDAN et. al., 1993).

Assim, observamos uma tendência no aumento da fração celular na fase G1 no tratamento com o AR, tanto em monoterapia quanto em terapia combinada com o quimioterápico paclitaxel. Também observamos uma diminuição no número de células na fase G2/M, principalmente, com o AR em monoterapia (Figura 18).

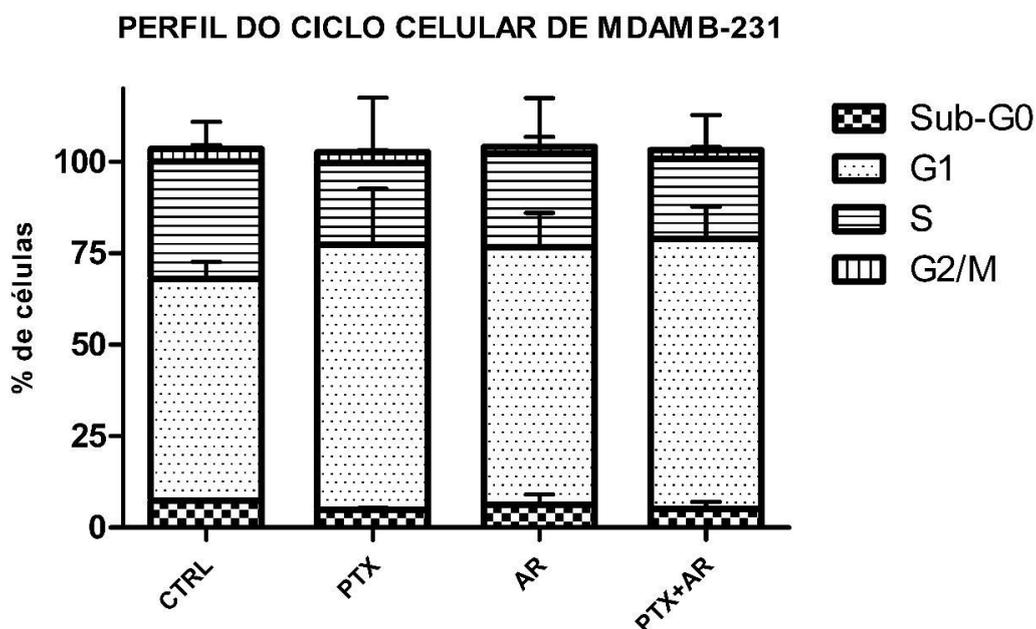


Figura 18: Análise do ciclo celular na linhagem MDAMB-231 após tratamento com ácido rosmarínico e paclitaxel.

As células foram tratadas por 72h com DMSO 20% (controle), AR IC_{50} 80 μ M, PTX IC_{50} 7,4 $\times 10^{-3}$ μ M e combinação de AR com PTX. As leituras foram feitas em citômetro FACSCanto II em dois experimentos independentes.

Em um estudo realizado por Wu e colaboradores (2015) em células de leucemia linfoblástica aguda, observou-se que o AR induziu uma leve parada na fase G2/M e, em altas concentrações, aumentou o número de células na fase sub-G1. A parada em G2/M pode estar associada ao dano ao DNA, reparo do DNA e sobrevivência celular, enquanto a fase sub-G1 está relacionada à indução de apoptose celular.

Saiko e colaboradores (2015) também observaram que em linhagem de leucemia promielocítica HL-60 o resultado foi semelhante com o AR, na concentração de 150 μ M, aumentando a fração celular na fase G0-G1 e reduzindo o número das mesmas em G2/M.

5.6 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS QUE PODEM ESTAR ENVOLVIDAS NOS MECANISMOS DE AÇÃO DO ÁCIDO ROSMARÍNICO

Com o intuito de compreendermos melhor o papel do AR no regime terapêutico das linhagens de CAM do tipo luminal A MCF-7 e do TNBC MDAMB-231, realizamos análises de expressão protéica através da técnica de Western Blot. Para tal, foram avaliadas as proteínas envolvidas na via de autofagia LC3 e P62 e a proteína pró-apoptótica BAX em ambas as linhagens. Os tratamentos foram realizados com o AR e com o quimioterápico paclitaxel em monoterapia e em terapia combinada.

Nas células da linhagem MCF-7 tratadas com 50 μ M do AR em associação com paclitaxel na IC_{50} foi possível observar uma tendência no aumento da fosforilação da proteína LC3 (LC3II) envolvida na via de sinalização da autofagia, comparado aos demais tratamentos. O AR em monoterapia também aumentou a atividade da proteína LC3 em comparação ao controle (Figura 19).

Na linhagem TNBC MDAMB-231 o tratamento combinado de AR na concentração da IC_{50} (80 μ M) com o paclitaxel também aumentou a fosforilação desta proteína quando comparado ao controle (Figura 20).

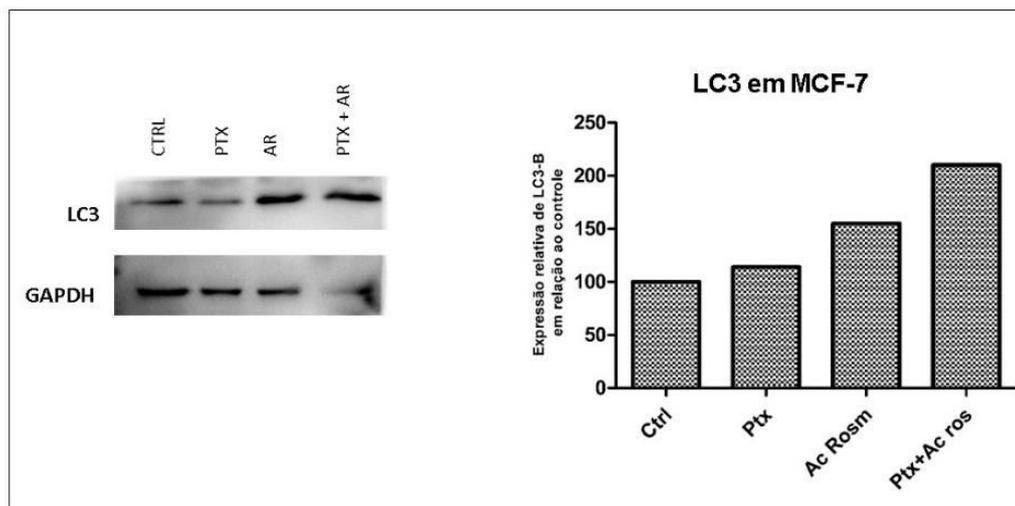


Figura 19: Análise da expressão de LC3 na linhagem MCF-7. As células foram tratadas com o ácido rosmarínico e PTX em monoterapia e em associação. Para a análise da densitometria de bandas das amostras foi utilizado o programa ImageLab. Como normalizador foi utilizado GAPDH. N = 1.

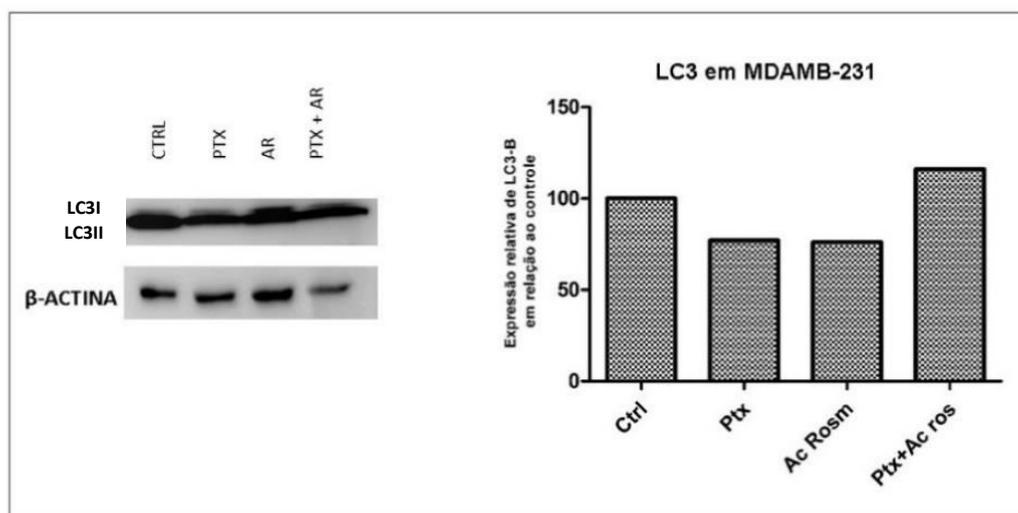


Figura 20: Análise da expressão de LC3 na linhagem MDAMB-231. As células foram tratadas com o ácido rosmarínico e PTX em monoterapia e em associação. Para a análise da densitometria de bandas das amostras foi utilizado o programa ImageLab. Como normalizador foi utilizado β -actina. N = 1.

Durante a formação do autofagossomo há uma lipidação da proteína LC3, sendo formadas duas isoformas desta proteína, LC3I e LC3II. Entretanto, quando há um aumento na expressão de LC3II significa que as células estão em processo autofágico (MIZUSHIMA; YOSHIMORI, 2007).

Gao Q. e colaboradores (2014) observaram que em linhagem de carcinoma hepatocelular HepG2 o ácido carnósico, um outro componente do

alecrim, aumentou a expressão da proteína LC3 e, conseqüentemente, a autofagia por meio do aumento dos vacúolos autofágicos e dos autolisossomos.

A análise da expressão da proteína p62 na linhagem MCF-7 mostrou uma tendência no aumento desta, tanto em monoterapia quanto em terapia combinada com o paclitaxel. Na linhagem MDAMB-231 também observamos um acentuado aumento na expressão desta proteína quando tratada com o AR em combinação com o paclitaxel comparado ao controle (Figura 21 e 22).

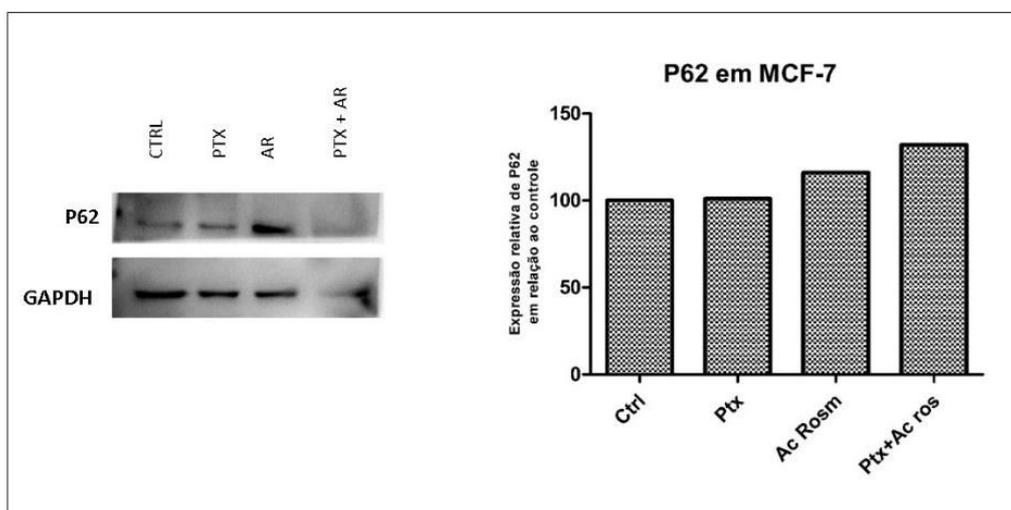


Figura 21: Análise da expressão de P62 na linhagem MCF-7. As células foram tratadas com o ácido rosmarínico e PTX em monoterapia e em associação. Para a análise da densitometria de bandas das amostras foi utilizado o programa ImageLab. Como normalizador foi utilizado GAPDH. N = 1.

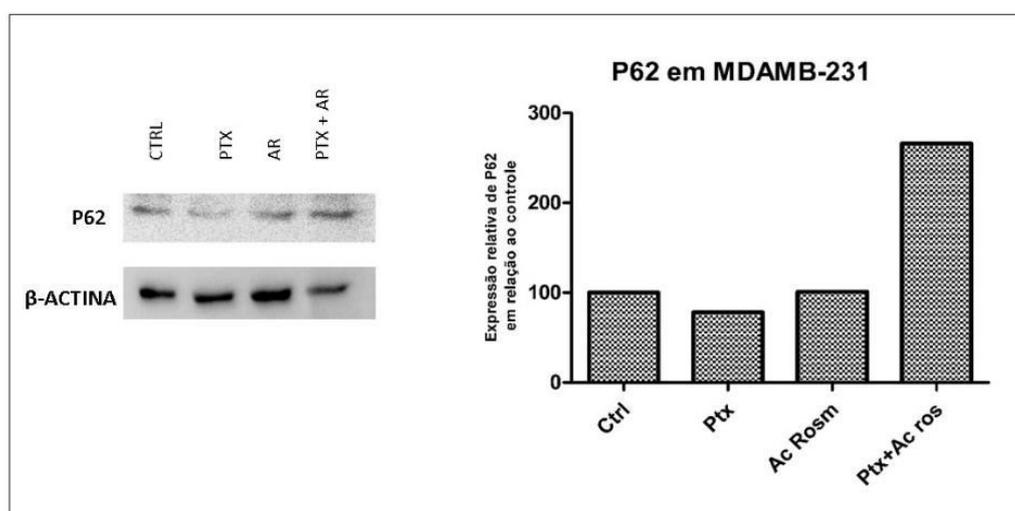


Figura 22: Análise da expressão de P62 na linhagem MDAMB-231. As células foram tratadas com o ácido rosmarínico e PTX em monoterapia e em associação. Para a análise da densitometria de bandas das amostras foi utilizado o programa ImageLab. Como normalizador foi utilizado β -actina. N = 1.

A via de autofagia (Figura 23) é uma via de reciclagem e limpeza celular. É uma via catabólica essencial que degrada componentes celulares dentro do lisossoma, onde as organelas celulares que já não se encontram funcionais são abrangidas por uma membrana sendo decompostas. Neste momento, ocorre a formação do autofagossomo que se funde com os lisossomos para degradar os conteúdos sequestrados e a membrana interna através de hidrolases lisossômicas. Os aminoácidos, produtos finais da degradação de componentes citosólicos, podem ser reutilizados pela célula e atuam como reguladores de retroalimentação negativa para o processo de autofagia (LEVINE; KROEMER, 2008).

A autofagia é um processo coordenado por um grupo de genes denominado *Atg* (*autophagy*). Porém, outras proteínas são importantes na sinalização da autofagia, modulando o processo autofágico positiva ou negativamente. A proteína mTOR é uma molécula-chave em vias de sinalização de detecção de nutrientes que participa na regulação da autofagia. Quando a autofagia e a síntese proteica são ativadas, Akt fosforila a proteína mTOR no sítio de ativação Ser2448 e, a partir desta primeira fosforilação, mTOR realiza autofosforilação da Ser2481. Uma vez ativada, mTOR inibe o processo autofágico e ativa a proteína p70^{S6}, uma cinase ativada por sinalização mitogênica requerida para o crescimento celular e passagem pela fase G1 do ciclo celular. (DERETIC, 2010; RAVIKUMAR et. al., 2010).

Uma das proteínas participantes dessa via é a cadeia leve 3 da proteína 1 associada a microtúbulos, conhecida como proteína LC3, que está presente no meio celular em duas isoformas: LC3I (citosólica) e LC3II (ligada ao autofagossomo durante a autofagia). A expressão da LC3II como um potencial marcador de autofagia também tem sido bastante investigada. A LC3 é a única proteína *Atg* que se encontra em células eucariontes associada ao autofagossoma maduro (CHU et. al., 2014). Entretanto, estudos recentes sugerem que a LC3 pode servir como um meio para facilitar a ativação da apoptose através da caspase 8, porque a proteína p62 interage com a caspase 8. Sendo assim, o acúmulo de p62 e LC3 leva à agregação e auto-ativação de caspase 8 resultando em apoptose (YOUNG; TAKAHASHI; KHAN, 2012).

A proteína p62 atua como seletora de substratos, sendo uma proteína reguladora da entrega de organelas disfuncionais, proteínas agregadas ou enroladas de forma incorreta e proteínas ubiquitinadas para a eliminação através da autofagia. Assim, a p62 pode ser de grande importância no mecanismo de controle para a eliminação de componentes tóxicos desempenhando funções na carcinogênese (MOSCAT; DIAZ-MECO 2009; ITAKURA; MIZUSHIMA 2011; YOUNG; TAKAHASHI; KHAN, 2012)

Em um estudo feito em linhagem de carcinoma hepatocelular, o AR aumentou a caspase 8 e, conseqüentemente, a apoptose sugerindo o papel do AR nesta via (LIN C.-S. et. al., 2007).

Nos modelos experimentais de autofagia deficiente, os tumores crescem mais rapidamente. Estas evidências sugerem que a autofagia é um mecanismo supressor de tumor e que a redução dos níveis autofágicos poderia promover a tumorigênese. Além disso, a autofagia é regulada negativamente pela via PI3K/Akt/mTOR e o desenvolvimento neoplásico é frequentemente iniciado através de mutações que aumentam a sinalização por essa via (DEGENHARDT et. al., 2006; LEVINE; KROEMER, 2008).

Os mecanismos pelos quais a autofagia é capaz de inibir a tumorigênese envolvem a diminuição da capacidade de reduzir os danos celulares, a diminuição da instabilidade genômica e a diminuição do estresse oxidativo, bem como a eliminação de proteínas e organelas danificadas. Por outro lado, ao inibir o processo de apoptose induzido pela falta de interações corretas entre as células neoplásicas e a matriz extracelular, estudos sugerem que a autofagia pode contribuir para a tumorigênese e o desenvolvimento de metástases (LEONE; AMARAVADI, 2013). Sendo assim, a autofagia pode apresentar efeitos diferenciados, dependendo do tipo de célula ou alteração genética associada, caracterizando-se como um processo multifacetado (AKAR et. al., 2008).

Ademais, a autofagia mantém a sobrevivência de células tumorais em resposta ao estresse metabólico, com exceção dos processos de necrose e inflamação, especialmente quando a apoptose está inibida. A autofagia diminui a massa mitocondrial por mitofagia (degradação mitocondrial por autofagia) e reduz a susceptibilidade das células à apoptose por estímulos mitocondriais (MAYCOTTE; THORBURN, 2011). Assim, pode-se propor que as células

tumorais induzem a autofagia para sobreviver ao estresse metabólico no microambiente tumoral e para evitar a apoptose induzida por terapia.

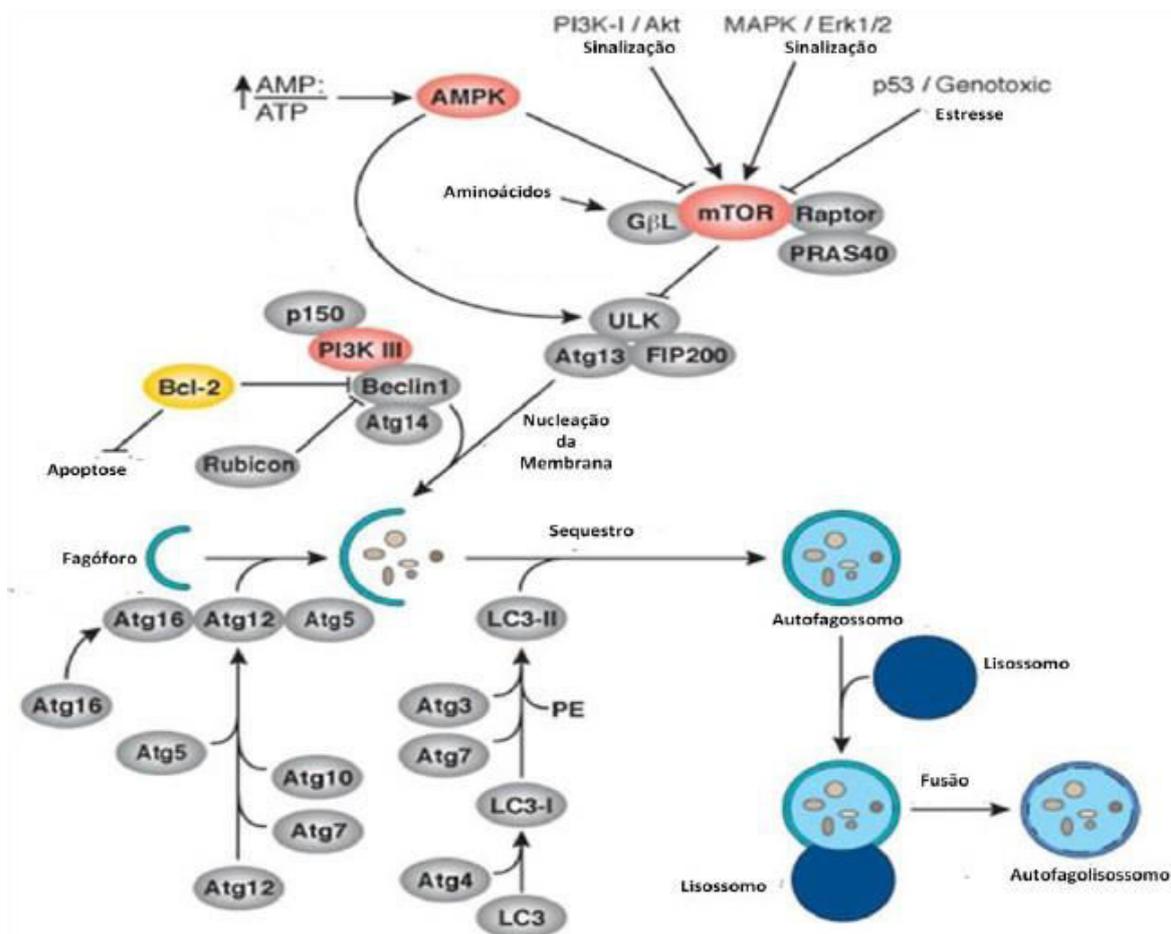


Figura 23: Via de regulação da autofagia.

Fonte modificada: <http://www.cellsignal.com/pathways/autophagy-signaling.jsp>.

Ainda, motivados em investigar se o efeito citotóxico do AR pode estar relacionado à apoptose, avaliamos a expressão de um importante membro da família Bcl-2, a proteína pró-apoptótica Bax (HASSAN et. al., 2014). A apoptose é um processo de morte celular programada essencial para eliminar células supérfluas ou defeituosas. Este fenômeno de morte celular possui um importante papel na manutenção da homeostase tecidual e é essencial em várias condições patológicas, incluindo o câncer (ANAZETTI; MELO, 2007).

A família Bcl-2 é uma família de proteínas indutoras e repressoras de morte por apoptose que participam ativamente da regulação da apoptose. Os membros da família Bcl-2 inibem a apoptose, pois previnem a liberação da proteína citocromo c e são chamados de reguladores anti-apoptóticos. Por outro

lado, Bax é uma proteína pró-apoptótica (HENGARTNER, 2000). A homeostasia é mantida pelo controle da quantidade de proteínas anti-apoptóticas e pró-apoptóticas. Estímulos, como dano ao DNA, levam ao aumento na expressão das proteínas pró-apoptóticas. Esse desequilíbrio induz à apoptose (PETROS et. al., 2004).

Após um estímulo de morte, a Bcl-2 inibe a permeabilização da membrana externa da mitocôndria pelo seqüestro de Bax ou por competir por sítios que seriam ocupados pela Bax na membrana externa mitocondrial. A redução na atividade da Bcl-2 é suficiente para induzir a célula a entrar em apoptose (MURPHY et. al., 2000). Entretanto, Bax também pode promover a apoptose através da interação com a mitocôndria de forma independente da interação com proteínas anti-apoptóticas (PETROS et. al., 2004).

Em um estudo realizado por Petiwala e colaboradores (2014), em linhagem de carcinoma de próstata, o tratamento com alecrim aumentou a expressão da proteína Bax e a apoptose e diminuiu a proliferação celular. O ácido carnósico, outro ingrediente ativo do alecrim, também promoveu o aumento de Bax e, conseqüentemente, da apoptose em linhagens de adenocarcinoma colorretal (KIM et. al., 2014; KIM et. al., 2016).

Estudos *in vivo* e *in vitro* também confirmaram o papel do AR nesta via inibindo a expressão da proteína Bcl-2 e aumentando a apoptose (LIN et. al., 2007; ANUSUYA; MANOHARAN, 2011).

No entanto, em nosso estudo, na linhagem MCF-7 observou-se que o tratamento com 50 μ M de AR em monoterapia não promoveu modulação da expressão de Bax em relação ao controle. Além disso, ao analisarmos os efeitos do paclitaxel em monoterapia é possível observar uma tendência na diminuição de Bax (Figura 24).

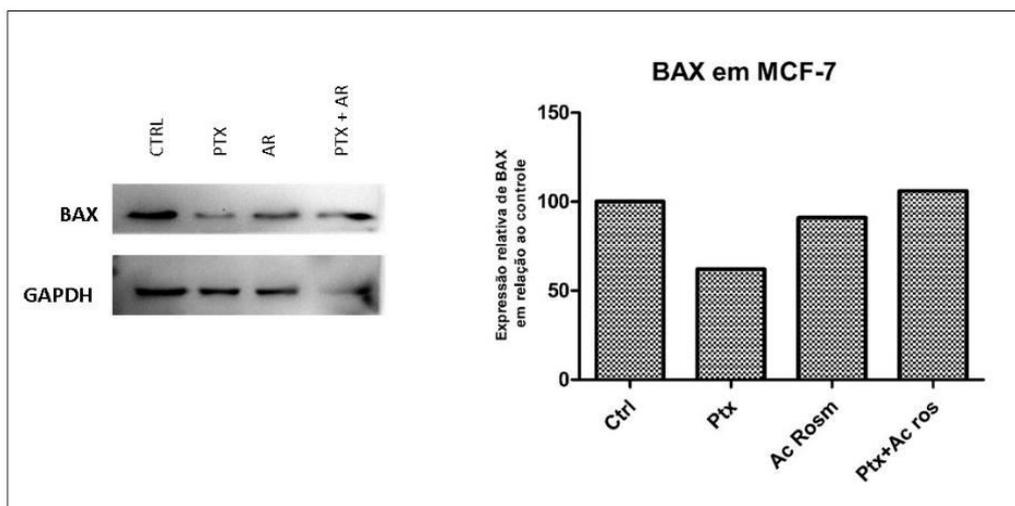


Figura 24: Análise da expressão de BAX na linhagem MCF-7. As células foram tratadas com o ácido rosmarínico e PTX em monoterapia e em associação. Para a análise da densitometria de bandas das amostras foi utilizado o programa ImageLab. Como normalizador foi utilizado GAPDH. N = 1.

Na linhagem MDAMB-231, também observamos uma acentuada redução na fosforilação de Bax tanto em monoterapia quanto em terapia combinada com o agente quimioterápico paclitaxel quando comparado ao controle (Figura 25).

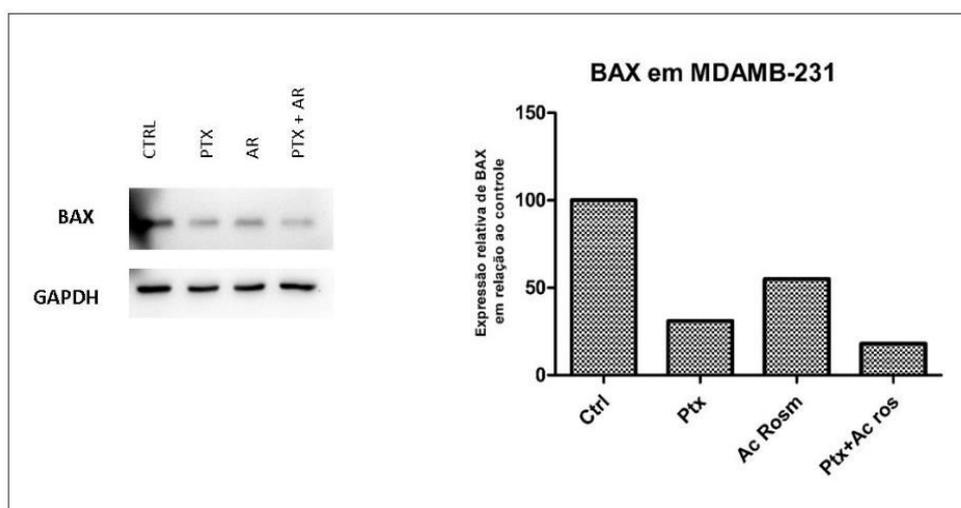


Figura 25: Análise da expressão de BAX na linhagem MDAMB-231. As células foram tratadas com o ácido rosmarínico e PTX em monoterapia e em associação. Para a análise da densitometria de bandas das amostras foi utilizado o programa ImageLab. Como normalizador foi utilizado GAPDH. N = 2.

6 CONCLUSÃO

Os dados do presente trabalho nos permitem concluir que:

- Nas concentrações avaliadas o ácido rosmarínico não promoveu efeito antiproliferativo em linhagens de câncer de pulmão A549 e H460 e de ovário OVCAR3;

- Ácido rosmarínico diminuiu a proliferação celular em linhagens de câncer de ovário A2780 e SKOV-3 em 72h de tratamento, mas não em 48h, mostrando efeito tempo-dependente;

- O presente trabalho mostrou o potencial benefício antiproliferativo do ácido rosmarínico, de forma dose-dependente, na viabilidade celular metabólica em linhagens de câncer de mama do subtipo luminal A MCF-7 e TNBC MDAMB-231;

- Além disso, o ácido rosmarínico potencializou o efeito antineoplásico de cisplatina e paclitaxel nas linhagens de CAM mesmo nas concentrações mais baixas mostrando efeito sinérgico, o que possibilita a diminuição na concentração desses quimioterápicos e, portanto, a redução dos adversos efeitos da terapia convencional;

- O tratamento com ácido rosmarínico em monoterapia e em terapia combinada com paclitaxel afetou a viabilidade reprodutiva celular inibindo a formação de colônia nas linhagens de CAM;

- Nossos achados evidenciam que, dentre outros possíveis mecanismos, o ácido rosmarínico pode induzir a morte celular por autofagia;

- Em suma, por todos os aspectos apresentados e discutidos, acreditamos que o ácido rosmarínico pode vir a se tornar um potencial agente terapêutico contra o CAM, representando uma possibilidade real para contornar o dramático cenário dessa neoplasia.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Dada a relevância clínica do presente estudo, pretendemos prosseguir com as investigações da aplicabilidade do ácido rosmarínico em regimes terapêuticos contra o CAM, conforme descrito a seguir:

- Continuar as análises dos mecanismos de sinalização celular do ácido rosmarínico nas linhagens de CAM em monoterapia e em politerapia combinada com agentes antineoplásicos convencionais. Sendo assim, analisaremos o efeito do ácido rosmarínico sobre as vias de sinalização celular de JAK/STAT, NFκB, PI3K/AKT/mTOR e MAPK/ERK, bem como o possível envolvimento de caspases, BCL2, p53, dentre outros, através da técnica de imunoblotting;

- Prosseguir com as investigações das alterações no ciclo celular das linhagens celulares de CAM através da citometria de fluxo com a finalidade de diferenciar o efeito do tratamento com ácido rosmarínico sobre a proliferação celular (paradas no ciclo em G1/G0, S ou G2/M) em monoterapia e em terapia combinada com cisplatina e paclitaxel;

- Avaliar o papel do tratamento com AR em monoterapia e em politerapia na indução de apoptose, necrose, morte autofágica nas linhagens de CAM por citometria de fluxo e microscopia eletrônica de varredura e de transmissão;

- Realizar a dosagem de citocinas pró-inflamatórias, como IL6, IL1β, TNFα, dentre outras, nos meios condicionados das células tratadas com AR em monoterapia e em politerapia combinada com agentes antineoplásicos convencionais por Elisa;

- Analisar o efeito do ácido rosmarínico em monoterapia e em terapia combinada com antineoplásicos convencionais no potencial migratório apresentado pelas células em linhagens celulares de CAM através do ensaio de cicatrização;

- Realizar a quantificação das espécies reativas de oxigênio nas linhagens celulares de CAM tratadas com ácido rosmarínico em monoterapia e em politerapia combinada com cisplatina e paclitaxel;

- Avaliar o perfil proteico e identificar as moléculas diferencialmente expressas pelo método de proteômica em linhagens celulares de CAM após o tratamento com AR em mono e politerapia com os quimioterápicos padrão.

8 REFERÊNCIAS

AKAR U. et. al. Silencing of BCL-2 expression by small interfering RNA induces autophagic cell death in MCF-7 breast cancer cells. *Autophagy*. v. 4, n. 5, p. 669-79, 2008.

ALGECIRAS-SCHIMNICH. Ovarian cancer: review of current serum markers and their clinical applications – *Clinical Laboratory News*, 2013.

ALKAM et. al. A natural scavenger of peroxynitrites, rosmarinic acid, protects against impairment of memory induced by Abeta (25-35). *Behav Brain Res*. 18. v. 180, n. 2, p. 139-45, 2007.

AMERICAN CANCER SOCIETY - Breast cancer signs and symptoms. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/about/breast-cancer-signs-and-symptoms.html>>. Acesso em: 20 de agosto de 2017.

AMERICAN CANCER SOCIETY – Cancer Facts & Figures 2017. Disponível em: <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2017.html>>. Acesso em: 20 de agosto de 2017.

ANAZETTI M. C.; MELO P. S. Morte celular por apoptose: uma visão bioquímica e molecular. *Metrocamp* v. 1, n. 1, p. 37-58, 2007.

ANUSUYA C.; MANOHARAN S. Antitumor initiating potential of rosmarinic acid in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*. v. 30, p. 199–211, 2011.

ARAÚJO L. H. L. et. al. Uso de topotecan no tratamento do tumor epitelial de ovário refratário à platina: experiência do INCA. *Revista Brasileira de Cancerologia*. v. 54, n. 2, p. 131-138, 2008.

ARUOMA et. al. An evaluation of the antioxidant and antiviral action of extracts of rosemary and Provençal herbs. *Food Chem Toxicol.* v. 34, n. 5, p. 449-56, 1996.

BARLUND M. et. al. *Cancer Res.* v. 60, p. 5340, 2000.

BARROS A. C. S. D.; LEITE K. R. M. Classificação molecular dos carcinomas de mama: uma visão contemporânea. *Revista Brasileira de Mastologia.* v. 25, n. 4, p. 146-55, 2015.

BAUER K. R. et. al. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry. *Cancer.* v. 109, n. 9, p. 1721-1728, 2007.

BELLACOSA A. et. al. Molecular alterations of the AKT2 oncogene in ovarian and breast carcinomas. *Int J Cancer.* v. 64, n. 4, p.280-5, 1995.

BENDRE M. S. et. al. Interleukin-8 stimulation of osteoclastogenesis and bone resorption is a mechanism for the increased osteolysis of metastatic bone diseases. *Bone.* v. 33, n. 1, p. 2837, 2003.

BERDOWSKA I. et. al. Cytotoxic impact of phenolics from Lamiaceae species on human breast cancer cells. *Food Chem.* v. 141, p. 1313–1321, 2013.

BRADFORD M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *analytical biochemistry*, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

BULGAKOV; INYUSHKINA; FEDOREYEV. 2012 Rosmarinic acid and its derivatives: biotechnology and applications. *Crit Rev Biotechnol.* v. 32, n. 3, p. 203-17, 2012.

CAO F. et. al. Identification of an essential molecular contact point on the duck hepatitis B virus reverse transcriptase. *J Virol.* v. 79, n. 16, p. 10164–10170, 2005.

CAPELOZZI V. L. Role of immunohistochemistry in the diagnosis of lung cancer. *J Bras Pneumol.* v. 35, n. 4, p. 375-82, 2009.

CHEUNG S.; Tai J. Anti-proliferative and antioxidant properties of rosemary *Rosmarinus officinalis*. *Oncol. Rep.* v. 17, p. 1525–1531, 2007.

CHOI et. al. Peroxynitrite scavenging activity of herb extracts. *Phytother Res.* v. 16, n. 4, p. 364-7, 2002.

CHOU T. C. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res.* v. 70, n. 2, p. 440-6, 2010.

CHU S. C. et. al. Thymoquinone induces cell death in human squamous carcinoma cells via caspase activation- dependent apoptosis and lc3-ii activation-dependent Autophagy. *Plos One.* v. 9, n. 7, p. e101579, 2014.

CLARKE-PEARSON D. L. Clinical practice. Screening for ovarian cancer. *N Engl J Med.* v. 361, n. 2, p. 170-7, 2009.

COSTA M. A. D. L. C.; CHAGAS S. R. P. Neoadjuvant chemotherapy in operable breast cancer: literature review. *Revista Brasileira de Cancerologia.* v. 59, n. 2, p. 261-269, 2013.

DEBERSAC et. al. Induction of cytochrome P450 and/or detoxication enzymes by various extracts of rosemary: description of specific patterns. *Food Chem Toxicol.* v. 39, n. 9, p. 907-18, 2001.

DEGENHARDT K. et. al. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell.* v. 10, n. 1, p. 51-64, 2006.

DEL BAÑO M. J. et. al. Phenolic diterpenes, flavones, and rosmarinic acid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis*: antioxidant activity. *J Agric Food Chem*, v. 51, n. 15, p. 424753, 2003.

DERETIC. Autophagy in infection. *Curr Opin Cell Biol*. v. 22, n. 2, p. 252-62, 2010.

DOLL R. Etiology of lung cancer. In: Greenstein JP, Harrow A, eds. *Advances in cancer research*. New York: Academic Press. Vol 3, 1995.

ENGELMAN J. A.; LUO J.; CANTLEY L. C. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nature Reviews Genetics*, v. 7, n. 8, p. 606–19, 2006.

FADEL O.; EI KIRAT K.; MORANDAT S. The natural antioxidant rosmarinic acid spontaneously penetrates membranes to inhibit lipid peroxidation in situ. *Biochim Biophys Acta*. v. 1808, n. 12, p. 2973-80, 2011.

FECKA I; TUREK S. Determination of water-soluble polyphenolic compounds in commercial herbal teas from Lamiaceae: peppermint, melissa, and sage. *J Agric Food Chem*. v. 55, n. 26, p. 10908-17, 2007.

FERNANDEZ A.; JATENE F.B.; ZAMBONI M. Diagnóstico e estadiamento do câncer de pulmão. *J Pneumol*. v. 28, n. 4, p. 219-228, 2002.

FORGACS E. et. al. Mutation analysis of the PTEN/MMAC1 gene in lung cancer. *Oncogene*. v. 17, n. 12, p. 1557-65, 1998.

FRANKEN N. A. et. al. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc*. v. 1, n. 5, p. 2315-9, 2006.

GAO W. et. al. Highly sensitive detection of multiple tumor markers for lung cancer using gold nanoparticle probes and microarrays - *Analytica Chimica Acta*. v. 958, p. 77 – 84, 2017.

GAO Q. et. al. Carnosic acid induces autophagic cell death through inhibition of the Akt/mTOR pathway in human hepatoma cells. *J. Appl. Toxicol.* p. 485–492, 2014.

GIL E. S.; ENACHE T. A.; LIVEIRABRETT A. M. Redox behaviour of verbascoside and rosmarinic acid. *Comb Chem High Throughput Screen*, v. 16, n.2, p. 927, 2013.

GOBBI H. Classification of tumours of the breast: an update based on the new 2012 World Health Organization Classification. *J Bras Patol Med Lab*. v. 48, n. 6 p. 463-474, 2012.

GOLDHIRSCH A. et. al. Strategies for subtypes-dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer. *Ann Oncol*. v. 22, n. 8, p. 1736-47, 2011.

GUBBELS J. A. A. et. al. The detection, treatment, and biology of epithelial ovarian cancer. *J Ovarian Res*. v. 3, p. 8, 2010.

HABTEMARIAM S. The Therapeutic Potential of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) Diterpenes for Alzheimer's Disease. *Evid Based Complement Alternat Med*. p. 2680409, 2016.

HAHNEN E. et. al. Germline e Mutation Status, Pathological Complete Response, and Disease-Free Survival in Triple-Negative Breast Cancer - Secondary Analysis of the Gepar Six to Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol*. p. 1007, 2017.

HARAGUCHI H. et. al. Inhibition of lipid peroxidation and superoxide generation by diterpenoids from *Rosmarinus officinalis*. *Planta Med.* v. 61, n. 4, p.333-6, 1995.

HASSAN M. et. al. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *BioMed Research International.* v. 2014, 2014.

HENGARTNER M. O. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* v. 407, p. 770-776, 2000.

HERSCHKOWITZ J. I. et. al. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol.* v. 8, n. 5, p. R76, 2007.

HOSSAIN M. B. et. al. Antioxidant activity guided separation of major polyphenols of marjoram (*Origanum majorana* L.) using flash chromatography and their identification by liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Sep Sci.* v. 37, n. 22, p. 320513, 2014.

HUGHES J, WEIL H. Asbestosis as a necessary precursor of asbestos related lung cancer. Results of a prospective mortality study in asbestos products manufacturing. *Br J Ind Med.* p. 48, p. 229-33, 1991.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf>> Acesso em: 20 de agosto de 2016.

ITAKURA E, MIZUSHIMA N. p62 Targeting to the autophagosome formation site requires self-oligomerization but not LC3 binding. *J Cell Biol.* v. 192, v. 1, p. 17-27, 2011.

JACINTO E. et. al. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nature Cell Biology.* v. 6, p. 1122–1128, 2004.

JORDAN M. A. et. al. Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentrations. *Proc Natl Acad Sci USA*. v. 90, n. 20, p. 9552-6, 1993.

MURPHY K. M. et. al. Bcl-2 inhibits Bax translocation from cytosol to mitochondria during drug-induced apoptosis of human tumor cells. *Cell Death Differ*. v. 7, n. 1, p. 102-111, 2000.

KAKU T. et. al. Histological classification of ovarian cancer. *Med Electron Microsc*. v. 36, n. 1, p.9-17, 2003.

KHOJASTEH A. et. al. New trends in biotechnological production of rosmarinic acid. *Biotechnol Lett*. v. 36, n. 12, p. 2393-406, 2014.

KIM J. H.; JOU I.; JOE E. H. Suppression of miR-155 Expression in IFN- γ -Treated Astrocytes and Microglia by DJ-1: A Possible Mechanism for Maintaining SOCS1 Expression. *Exp Neurobiol*. v. 23, n. 2, p. 148-54, 2014.

KIM D. H. et. al. Carnosic acid inhibits STAT3 signaling and induces apoptosis through generation of ROS in human colon cancer HCT116 cells. *Mol. Carcinog*. v. 55, p. 1096–1110, 2016.

KIM Y.J. et. al. Carnosic acid suppresses colon tumor formation in association with anti-adipogenic activity. *Mol. Nutr. Food Res*. v. 58, p. 2274–2285, 2014.

KOLETTAS E. et. al. Rosmarinic acid failed to suppress hydrogen peroxidemediated apoptosis but induced apoptosis of Jurkat cells which was suppressed by Bcl2. *Mol Cell Biochem*, v. 285, n.12, p. 11120, 2006.

KREIKE B. et. al. Gene expression profiling and histopathological characterization of triple-negative/basal-like breast carcinomas. *Breast Cancer Res*. v. 9, n. 5, p. R65, 2007.

LAEMMLI U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, p. 680–685, 1970.

LEE J. et. al. Rosmarinic acid as a downstream inhibitor of IKK-beta in TNF-alpha-induced upregulation of CCL11 and CCR3. *Br J Pharmacol.* v. 148, n. 3, p. 366-75, 2006.

LEONE R. D.; AMARAVADI R. K. Autophagy: a targetable linchpin of cancer cell metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* v. 24, n. 4, p. 209-17, 2013.

LEVINE B, KROEMER G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell.* v. 132, n. 1, p. 27-42, 2008.

LI L.; TIAN J. W.; LIANG X. G. Regression of atherosclerosis by rosmarinic acid via regulating lipid metabolism and anti-inflammatory actions. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology.* v. 44, n. 4, p. 719-719, 2008.

LI M. et. al. Incidence of BRCA1 somatic mutations and response to neoadjuvant chemotherapy in Chinese women with triple-negative breast cancer. *Gene.* v. 584, n. 1, p. 26-30, 2016.

LIN C. S. et. al. Growth inhibitory and apoptosis inducing effect of *Perilla frutescens* extract on human hepatoma HepG2 cells. *J. Ethnopharmacol.* v. 112, n. 3, p. 557–567, 2007.

LISTER-SHARP D. et. al. A rapid and systematic review of the effectiveness and cost-effectiveness of the taxanes used in the treatment of advanced breast and ovarian cancer. 2000. In: *Database of Abstracts of Reviews of Effects*. Disponible em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK68267/>>

LIU J. et. al. MiR-155 inhibits cell migration of human cardiomyocyte progenitor cells (hCMPCs) via targeting of MMP-16. *J Cell Mol Med.* v. 16, n. 10, p. 2379-86, 2012.

LIU W.; ZHANG X. Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)/RANK/osteoprotegerin system in bone and other tissues (review). *Mol Med Rep.* v. 11, n. 5, p. 3212-8, 2015.

MALKINSON A. M. Role of inflammation in mouse lung tumorigenesis: a review. *Exp Lung Res.* v. 31, n. 1, p. 57-82, 2005.

MAYCOTTE P.; ANDREW T. Autophagy and cancer therapy. *Cancer Biology & Therapy.* v. 11, n. 2, p. 127–137, 2011.

MCGUIRE W. P.; MARKMAN M. Primary ovarian cancer chemotherapy: current standards of care. *Br J Cancer.* v. 89, n. 3, p. S3-8, 2003.

MIZUSHIMA N.; YOSHIMORI T. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy.* v. 3, n. 6, p. 542-5, 2007.

HASSAN M. et. al. Signaling pathways as therapeutic target in tumor treatment. *VRI Cell Signaling,* v. 2, n. 1, 2014.

MOON D. O. et. al. Rosmarinic acid sensitizes cell death through suppression of TNF- α -induced NF- κ B activation and ROS generation in human leukemia U937 cells. *Cancer Lett,* v. 288, n. 2, p. 18391, 2010.

MOORE J. et. al. Rosemary extract reduces Akt/mTOR/p70S6K activation and inhibits proliferation and survival of A549 human lung cancer cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* v. 83, p. 725-732, 2016.

MORCH L. S. et. al. Hormone therapy and ovarian cancer. *JAMA.* v. 302, n. 3, p. 298-305, 2009.

MOSCAT J.; DIAZ-MECO M. T. p62 at the crossroads of autophagy, apoptosis, and cancer. *Cell.* v. 137, n. 6, p. 1001-4, 2009.

MURPHY KM. et. al. Bcl-2 inhibits Bax translocation from cytosol to mitochondria during drug-induced apoptosis of human tumor cells. *Cell Death Differ.* v. 7, p. 102-11, 2000.

NEWMAN D. J.; CRAGG G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J Nat Prod.* v. 75, n. 3, p. 31135, 2012.

NGUYEN L. et. al. Biomarkers for early detection of ovarian cancer. *Womens Health (Lond).* v. 9, n. 2, p. 171-85, 2013.

NIH - Lister Hill National Center for Biomedical Communications U.S. National Library of Medicine National Institutes of Health Department of Health & Human Services Published September 5, 2017.

NOVAES F. T. et. al. Câncer de pulmão: histologia, estágio, tratamento e sobrevida. *Jornal Brasileiro de Pneumologia.* v. 34, n. 8, 2008.

OGU C.C.; MAXA J.L. Drug interactions due to cytochrome P450. *Proc (Bayl Univ Med Cent).* v. 13, n. 4, p. 421-3, 2000.

OKAMURA N. et. al. Flavonoids in *Rosmarinus officinalis* leaves. *Phytochemistry.* v. 37, n. 5, p. 1463-6, 1994.

OZOLS R. F. Systemic therapy for ovarian cancer: current status and new treatments. *Semin Oncol.* v. 33, n. 2 p. S3-11, 2006.

PALUSZCZAK J.; KRAJKAKUŹNIAK V.; BAERDUBOWSKA W. The effect of dietary polyphenols on the epigenetic regulation of gene expression in MCF7 breast cancer cells. *Toxicol Lett,* v. 192, n. 2, p. 11925, 2010.

PETERSEN M.; SIMMONDS M. S. Rosmarinic acid. *Phytochemistry,* v. 62, n. 2, p. 1215, 2003.

PETIWALA S.M. et. al. Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) Extract Modulates CHOP/GADD153 to Promote Androgen Receptor Degradation and Decreases Xenograft Tumor Growth. *PLoS ONE*. v. 9, p. e89772, 2014.

PETROS A. M. et. al. Defining the p53 DNA-binding domain/Bcl-xL-binding interface using NMR. *FEBS Letters*. p. 559, 2004.

PETRULEA, MS et. al. PI3K/Akt/mTOR: A promising therapeutic target for non-medullary thyroid carcinoma. *Cancer Treatment Reviews*, v. 41, n. 8, p. 707–13, 2015.

PLUMB J. A. Cell sensitivity assays: clonogenic assay. *Methods Mol Med*. v. 88, p. 159-64, 2004.

POLYAK K. Breast cancer: origins and evolution. *J Clin Invest*. v. 117, p. 3155-63, 2007.

PRAT A. et. al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res*. v. 12, n. 5, p. R68, 2010.

QIAO S. et. al. Involvement of peroxynitrite in capsaicin-induced apoptosis of C6 glioma cells. *Neurosci Res*. v. 51, n. 2, p. 175-83, 2005.

RAKHA E. A. et. al. breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *BREAST CANCER RES*. v. 12, n. 4, p. 207, 2010.

RAVIKUMAR B. et. al. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*. v. 90, n. 4, p. 1383-435, 2010.

RECK M. et. al. Ipilimumab in combination with paclitaxel and carboplatin as first-line therapy in extensive-disease-small-cell lung cancer: results from a randomized, double-blind, multicenter phase 2 trial. *Ann Oncol*. v. 24, n. 1, p. 75-83, 2013.

REID P. E.; BROWN N. J.; HOLEN I. Breast cancer cells stimulate osteoprotegerin (OPG) production by endothelial cells through direct cell contact. *Moll Cancer*. v. 15, n. 8, p. 49, 2009.

RICE-EVANS C. Implications of the mechanisms of action of tea polyphenols as antioxidants in vitro for chemoprevention in humans. *Proc Soc Exp Biol Med*, v. 220, n. 4, p. 2626, 1999.

RISS T. L. et. al. Cell Viability Assays. *Assay Guidance Manual [Internet]*. [S.l.: s.n.], 2013. .

RITSCHER W. A. et. al. Percutaneous absorption of rosmarinic acid in the rat. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. v. 11, n. 5, p. 345-52, 1989.

RIVENBARK AG, O'CONNOR SM, COLEMAN WB. Molecular and cellular heterogeneity in breast cancer. Challenges for personalized Medicine. *Am J Pathol*. v. 183, p. 1113-24, 2013.

RODRIGUEZ-ANTONA C.; INGELMAN-SUNDBERG M. Cytochrome P450 pharmacogenetics and cancer. *Oncogene* v. 25, n. 11, p. 1679-91, 2006.

ROSEN D. G. et. al. The role of constitutively active signal transducer and activator of transcription 3 in ovarian tumorigenesis and prognosis. *Cancer* v. 107, n. 11, p. 2730-40, 2006.

SABAS C. V. et. al. *Oncologia Básica*. 1 ed., 2012.

SAIKO P. et. al. Epigallocatechin gallate, ellagic acid, and rosmarinic acid perturb dNTP pools and inhibit de novo DNA synthesis and proliferation of human HL60 promyelocytic leukemia cells: synergism with arabinofuranosylcytosine. *Phytomedicine*, v. 22, n. 1, p. 21322, 2015.

SAITO, M. et. al. Allelic imbalance and mutations of the *PTEN* gene in ovarian cancer. *Int. J. Cancer*, 85: 160–165, 2000.

SAMET J. Epidemiology of lung cancer. In: Lung biology in health and disease. New York: Marcel Dekker, 1994.

SANBONGI C. et. al. Rosmarinic acid inhibits lung injury induced by diesel exhaust particles. *Free Radic Biol Med*, v. 34, n. 8, p. 10609, 2003.

SARBASSOV D. D. et. al. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Molecular Cell*, v. 22, n. 2, p. 159–168, 2006.

SCHILER J. H. et. al. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. v. 346, n. 2, p. 92-8, 2002.

SCHÜLER S. et. al. Ovarian epithelial tumors and reproductive factors: a systematic review. *Arch Gynecol Obstet*. v. 287, n. 6, p. 1187-204, 2013.

SHARMILA R.; MANOHARAN S. Antitumor activity of rosmarinic acid in 7,12dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) induced skin carcinogenesis in Swiss albino mice. *Indian J Exp Biol*, v. 50, n. 3, p. 18794, 2012.

SHAYESTEH L. et. al. PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer. *Nat Genet*. v. 21, n. 1, p. 99-102, 1999.

SHE G. M. et.al. Polyphenolic acids from mint (the arterial of mentha haplocalyx briq.) with DPPH radical scavenging activity. *J Food Sci*. v. 75, n. 4, p. c359-62, 2010.

SHIH IE-MING; KURMAN R. J. A proposed Model Based on Morphological and Molecular Genetic Analysis. *Ovarian Tumorigenesis*, v. 164, n. 5, p. 1511–1518, 2004.

SHUAI H. et. al. AntiWarburg effect of rosmarinic acid via miR155 in gastric cancer cells. *Drug Des Devel Ther*, v. 9, p. 2695–703, 2015.

SILVA JR. W. A. The importance of genetic studies of lung cancer. *J Bras Pneumol.* v. 35, n. 8, p. 721-722, 2009.

SINGLETERY SE. Rating the risk factors for breast cancer. *Annals of Surgery.* v. 237, n. 4, p. 474-482, 2003.

SOUZA W.F. et. al. Sinalização celular em câncer - *Cienc. Cult.* v.66, n.1, 2014.

SUN M. et. al. AKT1/PKB alpha kinase is frequently elevated in human cancers and its constitutive activation is required for oncogenic transformation in NIH3T3 cells. *Am J Pathol.* v. 159, n. 2, p. 431-7, 2001.

TAI J. et. al. Antiproliferation effect of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) on human ovarian cancer cells in vitro. *Phytomedicine*, v. 19, n.5, p. 436-43, 2012.

TAO L. et. al. Phenolcarboxylic acids from medicinal herbs exert anticancer effects through disruption of COX2 activity. *Phytomedicine*, v. 25, n. 11, p. 1473-82, 2014.

TATO I. et. al. Amino acids activate mTOR complex 2 via PI3K/AKT signalling. *J. Biol. Chem.*, 2010

UEHARA C.; JAMNIK S.; SANTORO I.L. Câncer de pulmão. *Medicina* v. 31, p. 266-276, 1998.

VODUC K.D.; CHEANG M.C.U.; TYLDESLEY S. Breast cancer subtypes and risk of local and regional relapse. *J Clin Oncol.* v. 28, n.10, p. 1684-91, 2010.

VOET D.; VOET J.G.; PRATT C.W. *Fundamentos de Bioquímica: A Vida em Nível Molecular.* Artmed Editora Ltda – 4ª edição – 2014.

WU, C.-F. et. al. Molecular mechanisms of rosmarinic acid from *Salvia miltiorrhiza* in acute lymphoblastic leukemia cells. *J. Ethnopharmacol.* v. 176, p. 55–68, 2015.

XAVIER C. P. et. al. *Salvia fruticosa*, *Salvia officinalis*, and rosmarinic acid induce apoptosis and inhibit proliferation of human colorectal cell lines: the role in MAPK/ERK pathway. *Nutr Cancer*, v. 61, n. 4, p. 56471, 2009.

XIA Y.; SHEN S.; VERMA I.M. NF- κ B, an active player in human cancers. *CANCER IMMUNOL RES.* V. 2, N. 9 P. 823–830, 2014.

XU Y. et. al. Inhibition of bone metastasis from breast carcinoma by rosmarinic acid. *Planta Med*, v. 76, n. 10, p. 95662, 2010.

XU Y. et. al. Anti-invasion effect of rosmarinic acid via the extracellular signal-regulated kinase and oxidation-reduction pathway in Ls174-T cells. *J. Cell. Biochem.* v. 111, p. 370–379, 2010.

YESIL-CELIK TAS O. et. al. Inhibitory Effects of Rosemary Extracts, Carnosic Acid and Rosmarinic Acid on the Growth of Various Human Cancer Cell Lines. *Plant Foods Hum. Nutr.* v. 65, p. 158–163, 2010.

YOUNG M; TAKAHASHI Y; KHAN O. Autophagosomal membrane serves as platform for intracellular death-inducing signaling complex (idisc)-mediated caspase-8 activation and apoptosis. *J Biol Chem*, v. 287, p. 12455-12468, 2012.

ZAMBONI M. Epidemiologia do câncer do pulmão. *J. Pneumologia* v. 28, n.1, 2002.

ZAMBONI M. Lung cancer in COPD. *Pulmão* v. 22, n.2, p. 40-44, 2013.

ZHANG J. J. et. al. Rosmarinic acid inhibits proliferation and induces apoptosis of hepatic stellate cells. *Biol Pharm Bull*, v. 34, n. 3, p. 3438, 2011.

ZHANG Y. et. al. Effects of rosmarinic acid on liver and kidney antioxidant enzymes, lipid peroxidation and tissue ultrastructure in aging mice. *Food Funct*, v. 6, n.3, p. 92731, 2015.